

**UNTERSUCHUNGEN ZUM EMPFINDLICHEN NACHWEIS VON
DOPINGMITTELN
IM RAHMEN EINES TOXIKOLOGISCHEN ANALYSEENGANGES**

Der Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg

zur
Erlangung des Doktorgrades
vorgelegt
von
Manfred H. Wolf
aus
Nürnberg

OFFSETDRUCKEREI J. KRAUSE FREIBURG I. BR.

Freiburg i. Br. 1973

1973 # 312



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41548410_0021

**UNTERSUCHUNGEN ZUM EMPFINDLICHEN NACHWEIS VON
DOPINGMITTELN
IM RAHMEN EINES TOXIKOLOGISCHEN ANALYSENGANGES**

Der Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg

zur
Erlangung des Doktorgrades
vorgelegt
von
Manfred H. Wolf
aus
Nürnberg

OFFSETDRUCKEREI J. KRAUSE FREIBURG I. BR.

Freiburg i. Br. 1973

Als Dissertation genehmigt von der Naturwissenschaftlichen
Fakultät der Universität Erlangen-Nürnberg



Tag der mündlichen Prüfung: 11. Juli 1973

Dekan: Universitätsprofessor Dr. W. Heumann

Berichterstatter: Universitätsprofessor Dr. O. Dann

Berichterstatter: Universitätsprofessor Dr. G. Hauck

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von November 1967 bis August 1972 im Institut für Gerichtliche Medizin und Versicherungsmedizin der Universität Freiburg ausgeführt.

Für die Überlassung des Themas und die Übernahme des Referates danke ich Herrn Prof. Dr. G. Hauck, Institut für Rechtsmedizin, München.

Herrn Prof. Dr. O. Dann, Direktor des Instituts für Angewandte Chemie, Erlangen, gilt mein aufrichtiger Dank für die Nostrifizierung der Arbeit.

Dank schulde ich auch den Direktoren des Instituts für Gerichtliche Medizin und Versicherungsmedizin, Freiburg, Herrn Prof. Dr. W. Spann, Prof. Dr. B. Wuermeling und Prof. Dr. B. Forster, für die gewährte wirtschaftliche Unterstützung und die Bereitstellung der Arbeitsmöglichkeit.

INHALTSVERZEICHNIS

Seite

1.	Einführung	9
1.1.	Definition der Begriffe "Doping" und "Dopingmittel"	9
1.2.	Besonderheiten bei der Untersuchung und dem Untersuchungsmaterial	11
2.	Methoden der Literatur	13
2.1.	Verfahren zur Gruppentrennung und Anreicherung	14
2.1.1.	Extraktion	14
2.1.2.	Adsorption	17
2.1.3.	Destillation	19
2.1.4.	Derivatebildung	19
2.2.	Verfahren zum Nachweis und zur Identifizierung	21
2.2.1.	Dünnschichtchromatographie	21
2.2.1.1.	Trennsysteme	21
2.2.1.2.	Detektionsmittel	22
2.2.2.	Gaschromatographie	23
2.2.2.1.	Gebräuchliche Trennsysteme	23
2.2.2.2.	Derivatebildung	25
2.2.2.3.	Variation des Detektors	26
2.2.3.	UV-Spektrophotometrie	28
2.2.4.	IR-Spektrophotometrie	28
2.2.5.	Massenspektrometrie	29
2.2.6.	Kernresonanzspektrometrie	29
2.3.	Ergebnis der Literaturübersicht	30
3.	Eigene Untersuchungen	31
3.1.	Abtrennung und Anreicherung der Wirkstoffe aus wässriger Lösung in Form ihrer Hydrochloride	31
3.1.1.	Bestimmung der Wirksamkeit des gewählten Verfahrens	32
3.1.2.	Prüfung der Stabilität isolierter Verbindungen	37
3.2.	Versuche zu Nachweis- und Identifizierungsmethoden	42
3.2.1.	Dünnschichtchromatographie	42
3.2.1.1.	Arbeitsbedingungen	42
3.2.1.2.	Fließmittel mit Kieselgelschichten	43
3.2.1.3.	Fließmittel mit anderem Schichtmaterial	50
3.2.1.4.	Erzielte Trennungen	51
3.2.1.5.	Ausgewählte Sprühreagenzien	53
3.2.2.	Gaschromatographie	56
3.2.2.1.	Arbeitsbedingungen	56
3.2.2.2.	Erzielte Trennungen	57
3.2.2.3.	Extraktaufarbeitung zur Freisetzung der Basen	65
3.2.2.4.	Dampfraumanalyse	67
3.2.3.	IR-Spektrophotometrie	67
3.3.	Versuche zur Kombination DC - GC	68
3.3.1.	Elution des Substanzfleckes ohne Detektion	69
3.3.2.	Elution im Mikromaßstab nach vorausgegangener Detektion	70

3.4.	Versuche zu einem Gesamttrennungsgang aus biologischem Material	74
3.4.1.	Trennschema	75
3.4.1.1.	Aufarbeitung der Fraktionen	76
3.4.2.	Störungen bei altem Probenmaterial	78
3.4.3.	Mögliche Schwierigkeiten durch den Wirkstoff	85
3.4.3.1.	Gut wasserlösliche Verbindungen	85
3.4.3.2.	Verbindungen mit extrem niedriger DC-Erfassungsgrenze	92
3.4.3.3.	Säurelabile Verbindungen	93
3.4.4.	Wirksamkeit des Gesamtanalysenganges	94
3.5.	Arbeitsvorschriften	102
3.5.1.	Anreicherung und Gruppentrennung aus Harn	102
3.5.2.	Transfer B. HCl-Extrakt - Dünnschichtchromatographie	105
3.5.3.	Transfer Dünnschichtchromatographie - Gaschromatographie	105
4.	Diskussion der Ergebnisse	107
5.	Zusammenfassung	108
6.	Literaturverzeichnis	109

1. EINFÜHRUNG

Das Bestreben, die körperliche Leistungskraft durch den Genuß besonderer, teilweise mystischer Zubereitungen für Krieg und sportlichen Wettkampf zu steigern, läßt sich weit zurückverfolgen. Es erstaunt deshalb nicht, daß heute, da eine Palette hochwirksamer Pharmaka zur Verfügung steht, der Versuch der medikamentösen Leistungssteigerung im internationalen Hochleistungs- und Prestigesport eine gewichtige Rolle spielt.

Längst jedoch hat die mißbräuchliche Anwendung von Medikamenten zur Leistungssteigerung auf unser hektisches Alltagsleben übergreifen. Die Gefahr der entstehenden Drogenabhängigkeit oder der Tod als Folge der Überanstrengung durch Ausschaltung autonomer Schutzfunktionen sind bekannt. Neben der Kontrolle von Sportlern und der Überwachung von Süchtigen erscheint es daher notwendig, bei toxikologischen Analysen dieser Stoffgruppe vermehrte Aufmerksamkeit zu schenken, z.B. unter dem Gesichtspunkt der Teilnahme am Straßenverkehr unter Weckmitteleinfluß.

1.1. Definition der Begriffe "Doping" und "Dopingmittel"

Diesen im Sport allgemein mit dem Begriff Doping belegten Tatbestand der medikamentösen Manipulation galt es wegen der unterschiedlichen Auslegung mit internationaler Gültigkeit zu definieren. Ein vom Expertenkomitee des Europarates 1963 in Straßburg erarbeiteter Vorschlag, der auf weiteren Kongressen in Uriage, Madrid und Tokio geringfügig modifiziert wurde, lautet (PROKOP 112):

"Doping ist die Verabreichung oder der Gebrauch unphysiologischer Substanzen in jeder Form und physiologischer Substanzen in abnormer Dosis oder auf abnormalem Wege an gesunde Personen mit dem einzigen Ziel der künstlichen und unfairen Steigerung der Leistung für den Wettkampf".

Es war jedoch nötig, für eine Abgrenzung zur notwendigen Therapie zu ergänzen:

"Wird eine notwendige Behandlung mit Substanzen vorgenommen, die auf Grund ihrer Dosis, Natur oder Anwendung die Leistung des Athleten im Wettkampf künstlich oder unfair steigern könnten, gilt dies als Doping und schließt die Wettkampffähigkeit aus".

Diese zur Zeit international geltende Definition lag auch bei den Olympischen Spielen 1972 in München der Dopingkontrolle zugrunde (PROKOP 113).

Entsprechend der Anwendung der verschiedenen Definitionen des Dopingbegriffes für bestimmte Wettkämpfe variieren notgedrungen die jeweils erstellten Positivlisten stark. Durch den Übergang von Einzelsubstanzen

zu pharmakologischen Gruppen sucht man dem sich wandelnden Angebot bzw. Einsatz an Wirkstoffen gerecht zu werden. So weist die von der medizinischen Kommission des IOC im Mai 1971 festgelegte Liste der Dopingmittel folgende Gruppen und Substanzen auf (DOPING 52):

1. Psychomotorisch stimulierende Arzneistoffe

Amphetamin	Methamphetamin
Benzphetamin	Methylphenidat
Cocain	Norpseudoephedrin
Diäthylpropion	Phendimetrazin
Dimethylamphetamin	Phenmetrazin
Äthylamphetamin	Prolintan
Fencamfamin	und Derivate

2. Sympathicomimetische Amine

Ephedrin
 Methylephedrin
 Methoxyphenamin
 und Derivate

3. Verschiedene Stimulantien des Zentralen Nervensystems

Amiphenazol	Nikethamid
Bemegrid	Strychnin
Pentetrazol	und Derivate

4. Euphorisierende Schmerzmittel

Heroin	Dipipanon
Morphin	Pethidin
Methadon	und Derivate
Dextromoramid	

Wie dabei vermerkt, kann die Zahl der in Betracht kommenden Substanzen erweitert werden.

Soll die Dopingkontrolle dem Schutz des Aktiven vor gesundheitlichen Schäden dienen, so muß die Auswahl der Substanzklassen jedoch weiter gefaßt werden. Wie an Leistungssportlern gezeigt werden konnte, haben auch Placebos eine signifikante Steigerung sowohl der Kraft- als auch der Dauerleistungen herbeigeführt (PROKOP 111). Es verwundert deshalb nicht, daß bei Eigenmedikation, ohne medizinische Kenntnisse, häufig Leistungssteigerungen untauglichen Mitteln, die nicht unbedenklich sein müssen, zugeschrieben werden; sichergestellte Präparate bestätigen dies.

1.2. Besonderheiten bei der Untersuchung und dem Untersuchungsmaterial

Von der Dopinganalyse wird hohe Empfindlichkeit für eine eng begrenzte Stoffgruppe - meist nur der flüchtigen Basen - gefordert. Die Analyse zur Überprüfung von Drogenabhängigen erfaßt mit geringerer Sensitivität die unter das Betäubungsmittelgesetz fallenden Substanzen, nicht selten unter Einsatz einfacher und wirtschaftlicher Methoden.

Sollen im Rahmen der Dopingkontrolle sichergestellte Arzneizubereitungen identifiziert werden, so stehen hierfür erprobte Analysengänge der pharmazeutisch-chemischen Lehrbücher zur Verfügung, die durch Ergänzung, vor allem durch physiko-chemische Verfahren, hohen Beweiswert und Empfindlichkeit erreichen. Infolgedessen können sie auch ohne besondere Schwierigkeiten auf Material mit nur geringer Wirkstoffmenge angewendet werden, wie z. B. Tablettenabrieb, Rückstände an Injektionsbestecken bzw. Ampullen und Getränkereste. Da nach dem Doping Symposium (51) bei der Kontrolle "die Durchsuchung der mitgebrachten Sachen von Sportlern und Hilfspersonen einschließlich ihrer Kleidung" vorgesehen ist, fallen derartige Arzneimitteluntersuchungen in begrenztem Umfang an.

Bei intakten festen Zubereitungen kann die von HAUCK (68) vorgeschlagene Identifizierung nach äußeren Merkmalen nützliche Hinweise bringen.

Auf biologisches Ausgangsmaterial lassen sich Analysengänge für Arzneizubereitungen jedoch nicht grundsätzlich übertragen. Neben den sehr viel niedrigeren Konzentrationen des Wirkstoffes überwiegen bei weitem organische, physiologisch auftretende Ballastsubstanzen. Metabolische Besonderheiten des Stoffwechsels von Athleten des Hochleistungssportes erschweren die Analyse ebenso wie Anomalien bei Koma und Agonie, ganz abgesehen von Wirkstoffmetaboliten.

Harn⁺⁾ findet als bevorzugtes Probenmaterial Verwendung. Die zu erwartenden Konzentrationen liegen um den Faktor 10-100 über denen im Blut, insbesondere bei den konzentrierten Harnen nach länger dauernden Anstrengungen. LEBISH u. Mit. (84) konnten bei Drogenmißbrauch für Methamph-

+) Auf den Einsatz von Speichel, dem Hauptsubstrat der Dopinganalyse beim Pferd, wird, da beim Menschen zu wenig über die Konzentrations- und Ausscheidungsverhältnisse bekannt ist, verzichtet. Nach unbestätigten Befunden gelingt der Nachweis von Methamphetamin im menschlichen Speichel nach therapeutischen Dosen (CLASING u. Mit. 39).

tamin Harnkonzentrationen bis zum 500fachen der Blutkonzentration bestimmen. Während bei der Drogenüberwachung größere Harnmengen eingesetzt werden können, fallen bei der Dopingkontrolle und häufig für toxikologische Untersuchungen im forensischen Bereich kleine Probemengen (5-20 ml) an. Bei postmortal entnommenen Proben ist mit Veränderungen des Materials durch autolytische Prozesse zu rechnen. Nicht selten treten in dem begrenzten, einmaligen Probenmaterial zusätzliche, zur Behandlung kurz vor dem Tode verabreichte Medikamente und deren Abbauprodukte in Erscheinung.

Die Aufgabe der vorliegenden Arbeit sollte es deshalb sein, einen möglichst universellen Analysengang für organisches Material zu erarbeiten, der im Rahmen einer Gesamtanalyse, d.h. ohne Störung des Nachweises anderer Substanzgruppen, gebräuchliche Dopingmittel und basische Medikamente mit der im forensischen Bereich erforderlichen Sicherheit empfindlich erfaßt. Bei mittlerer Ausstattung eines toxikologischen Labors (z.B. mit nur einem Gaschromatographen) sollte ein hoher Probendurchsatz möglich sein.

2. METHODEN DER LITERATUR

Im Gegensatz zu vielen Verbindungen aus der Reihe der Psychopharmaka, z.B. der Phenothiazine, werden bei einem Großteil der Dopingmittel beträchtliche Mengen der unveränderten Substanz im Harn wiedergefunden. Die meisten Untersuchungsdaten liegen über die Ausscheidungsverhältnisse des Amphetamins bzw. Methylamphetamins vor. Besonders der Arbeitskreis um BECKETT hat sich mit diesem Problem befaßt.

BECKETT u. ROWLAND (13, 15) fanden, daß für die Amphetamine die pH-Verhältnisse des Harnes für die Ausscheidung von weitaus höherem Einfluß als die produzierten Harnmengen sind, wobei niedrige pH-Werte mit hohen Ausscheidungsraten korreliert sind. Dieser Befund wird auf die tubuläre Rückresorption des nichtionogenen Anteils zurückgeführt. In 48 Stunden fanden die Autoren 15-40 % der zugeführten Dosis an + Amphetamin im Harn wieder, während der Wert für - Amphetamin 30-66 % betrug.

Bei saurerer Harnreaktion durch Gaben von Ammoniumchlorid konnte im 48^h-Harn 60-70 % der applizierten Amphetaminmenge gefunden werden, während nach Gaben von NaHCO₃ in der gleichen Zeit weniger als 10 % unverändert anfielen. Wie WESLEY-HADZIJA (143) am Ausscheidungsverhalten zweier Kollektive mit diätbedingter unterschiedlicher Harnreaktion zeigen konnte, erreicht die Gruppe mit alkalischem Harn und geringerer ausgeschiedener Pharmakamenge nach eiweißreicher Nahrung schon nach kurzer Zeit die gleiche ausgeschiedene Amphetaminmenge wie die Vergleichsgruppe mit saurem Harn.

Für Methamphetamin fanden BECKETT u. ROWLAND (14) analoge Verhältnisse. Bei saurerer Harnreaktion (ca. pH 5,0) wurden in 16^h 55-70 % (neben 6-7 % Amphetamin) und bei basischer Harnreaktion (ca. pH 8,0) nur 0,6-2,0 % unverändert ausgeschieden.

Eine Korrelation der Ausscheidung der Basen mit den pH-Schwankungen während des Tagesablaufes wurde für eine Reihe der "klassischen" Dopingsubstanzen gefunden. Zur Bewertung einer gefundenen Harnkonzentration empfehlen die Autoren deshalb, stets bei der Probenentnahme die Harnreaktion zu bestimmen. BECKETT u. WILKINSON (18) bestätigen diesen Zusammenhang für Methylephedrin, Ephedrin und Norephedrin. Sie fanden bei schwankenden pH-Werten des Harnes in den ersten 24^h 32 % des Methylephedrins (neben 8 % Ephedrin), 80 % des Ephedrins (neben 4 % Norephedrin) und 91 % des Norephedrins nach oraler Aufnahme unverändert wieder.

KUNTZMANN u. Mit. (82) konnten für Pseudoephedrin eine Halbwertszeit im Plasma messen, die bei einer Harnreaktion um pH 8,0 doppelt so lang wie bei normalen Versuchspersonen lag. War die Harnreaktion auf pH 5,2 eingestellt, reduzierte sie sich auf ein Drittel des bei pH 8,0 bestimmten Wertes. Bei saurem Harn konnten innerhalb 24^h 70-80 % des oral applizierten Phentermins nachgewiesen werden (12), während bei Chlorphentermin nur 35 % gefunden wurden. OPITZ u. WEISCHER (106) konnten im Selbstversuch nach Einnahme von 75 mg Chlorphenterminhydrochlorid und pH-Werten des Harnes zwischen 5,9 und 8,6 39 % unverändert nachweisen. Sie berichten dabei über eine Ausscheidungsdauer von 6 bis 9 Tagen.

BÜLOW u. Mit. (31) fanden bei therapeutischer Dosierung nach einer Ausscheidungsdauer bis zu 10 Tagen 42-65 % unverändert im Harn wieder.

Auch wenn bei vielen Dopingsubstanzen die Ausscheidungs- und Abbauverhältnisse nicht annäherndgutuntersucht sind, liegt bei den meisten die unverändert ausgeschiedene Wirksubstanz in Größenordnungen vor, die einen Nachweis über sie sinnvoll macht.

2.1. Verfahren zur Gruppentrennung und Anreicherung

Beim Nachweis von Pharmaka in Körperflüssigkeiten steht wegen der geringen Konzentration der Wirkstoffe bzw. ihrer Abbauprodukte, neben großen Mengen an störenden organischen Ballaststoffen eine möglichst verlustarme Anreicherung bei der Aufarbeitung im Vordergrund. Die für pharmazeutisch-chemische Analysen entwickelten Variationen des STAS-OTTO Trennungsganges streben reine Fraktionen an, wobei Aufarbeitungsverluste, besonders bei Gewinnung der zahlreichen Untergruppen, in Kauf genommen werden (WINTERFELD 146, BAMANN u. ULLMANN 6, AUTERHOFF 4, MÜHLEMANN u. BÜRGIN 95).

Von ganz wenigen Ausnahmen abgesehen, wie z.B. beim gaschromatographischen Nachweis von flüchtigen Substanzen in Blutproben nach der Head-space Analyse nach HAUCK u. Mit. (69), muß auch bei ausreichender Empfindlichkeit der angewendeten Analysenmethode ein Reinigungsschritt eingeschaltet werden⁺). Allerdings kann bei hoher Empfindlichkeit eines spezifischen Nachweisverfahrens auf eine weniger zeitaufwendige Aufarbeitung zurückgegriffen, aber bisher nicht auf sie verzichtet werden.

2.1.1. Extraktion

Die weiteste Verbreitung bei der Isolierung niedrig dosierter Dopingmittel, d.h. im therapeutischen Bereich, fand bei den meisten Analysenmethoden die sowohl für pharmazeutische Zubereitungen als auch bei organischer Matrix angewendete Extraktion mit organischen Lösungsmitteln. Durch spezielle Variationen wird jedoch versucht, der Besonderheit des Probenmaterials gerecht zu werden.

Diskontinuierliche Verfahren werden wegen des geringeren Zeitbedarfs kontinuierlichen meist vorgezogen. Nach SCHILL (121) sind Überkapazitäten bei der Extraktion von biologischem Material, wie sie auch kontinuierliche Verfahren mit sich bringen, zu vermeiden. Die anfallenden unreinigten Extrakte erfordern in der Regel zusätzliche Aufarbeitungsschritte.

In ihrer für basische Arzneimittel allgemein entwickelten Aufarbeitung extrahieren VIDIC u. SCHÜTTE (135) bei pH 8,5 zunächst mit Cyclohexan und

⁺) Wenn man davon absieht, daß beim Temperieren der Probe im Gerät eine reproduzierbare Reinigung durch die Überführung in die Gasphase erreicht wird.

anschließend mit Amylacetat. Die beiden erhaltenen organischen Phasen werden in Anlehnung an JATZKEWITZ (76) nacheinander mit je 0,1 ml 15%iger Essigsäure und 0,5 N HCl extrahiert. Bei der anschließenden - damals dominierenden - papierchromatographischen Prüfung werden neben R_f-Wert und Farbreaktion durch das Auftreten der einzelnen Substanzen in den verschiedenen Extrakten zusätzliche Informationen gewonnen.

Die durch die Aufteilung in Unterfraktionen unvermeidliche Reduzierung der jeweils zur Verfügung stehenden Absolutmenge dürfte heute durch die Entwicklung weiterer spezifischer Nachweisverfahren als entscheidender Nachteil anzusehen sein.

EBERHARDT u. DEBACKERE (53) extrahieren die Gruppe der zentralstimulierenden Mittel bei pH 9-10 ohne saure Vorextraktion zweimal mit einer Mischung aus Äther und Methylacetat (1:1). Nach Vakuumeinengung erreichen sie Wiedergewinnungsraten von 30-50 %, die sie für ausreichend halten.

DEBACKERE u. LARUELLE (44) gewinnen bei der Untersuchung von Pferdeharn die basischen Extrakte nach einer Vorextraktion bei saurerer Reaktion, um den Anteil an Störsubstanzen für die anschließend durchgeführte Dünnschichtchromatographie (DC) in den Extrakten zu verringern. Sie verwenden dreimal 1/5 der Probenmenge an Chloroform und arbeiten bei pH 2 und pH 9-10. Sie vermerken jedoch, daß bei diesem Verfahren u. a. Papaverin und Strychnin im sauren Extrakt anfallen können, während beim Einsatz von Diäthyläther diese Verschiebung nicht beobachtet wird. Jedoch halten sie die dabei erzielten Extraktionsergebnisse für zu niedrig. Die Autoren nutzen die leichte Flüchtigkeit des Äthers durch Einsatz größerer Mengen an organischer Phase jedoch nicht.

Im Hinblick auf die allgemein beschriebene hohe Flüchtigkeit zahlreicher Basen (10, 20, 32, 34, 52, 56), z. B. auch der Amphetamine (trotz Sp. um 2000), ist das Einengen unter Vakuum bedenklich, insbesondere wenn bei Extraktionsmitteln mit hohem Siedepunkt bis zur Trockene abgedampft wird (COCHIN u. DALY 41, EBERHARDT u. Mit. 54).

BÄUMLER u. Mit. (10), BECKETT u. Mit. (17), BRANDENBERGER u. HELLBACH (26) z. B. suchen Abdunstverluste zu umgehen, indem sie nach der Extraktion mit Äther bei Normaldruck nicht bis zur Trockene einengen und die Extrakte sofort weiterverarbeiten.

MULÉ (97) verfährt bei der Drogenüberwachung folgendermaßen: 25 ml Harn werden bei pH 10-11 mit 12 ml Äthanol/Chloroform (1:3) durch 10minütiges Schütteln einer Einmalverteilung unterzogen. Die organische Phase wird nach Zusatz weiterer 12 ml der Mischung vom Rest der wässrigen Phase abgetrennt. Vor dem Einengen schlägt er wie HAUCK u. WOLF (70) den Zusatz geringer Mengen alkoholischer Salzsäure vor.

Da in der Regel größere Harnmengen zur Verfügung stehen, arbeitet MULÉ zum Zwecke einer raschen Durchführung der Analyse Anteile parallel auf saure Medikamente und nach der Hydrolyse auf Phenolbasen auf. Es wird dabei in Kauf genommen, daß die Farbstoffe des Harnes in jeder Fraktion stark auftreten. Bei nachfolgender DC erfaßt die Methode 1-5 µg/ml Harn.

Eine Anreicherung für eine allgemeine Orientierungsanalyse (Screening), bei der auf jegliche Gruppentrennung verzichtet wird, schlagen DAVIDOW u. Mit. (43) vor. Bei pH 9,5 werden 10 ml Harn mit 50 ml Chloroform/Isopropanol (960:40) einer Einmalverteilung unterzogen. Vor dem Abdunsten wird 1 Tropfen 0,1 N HCl zugesetzt. Bei Einsatz von nur einem Fließmittelgemisch wird mit einer Reihe von Reagenzien auf Anwesenheit von Arzneimitteln geprüft. Das System ist durch Zusatz von $100 \mu\text{g}/10 \text{ ml}$ Harn erprobt worden.

Dieses Verfahren dürfte besonders für die Überprüfung großer Probenzahlen an frischem Material mit relativ geringem Anteil an "Positiven" geeignet sein, da zusätzliche Identifizierungsverfahren unerlässlich sind, bei denen der Anteil an Störsubstanzen weitere Aufarbeitungsschritte erfordert.

Werden als Screening bzw. Identifizierungsverfahren nur GC-Methoden mit selektivem Stickstoffthermoionisationsdetektor oder gekoppeltem Massenspektrometer verwendet (2.2.2.3.), so konnten DONIKE u. Mit. (50) zeigen, daß eine durch Verteilung von 5 ml Harn, 2 ml Äther, 0,5 ml 5 N KOH unter Zusatz von 3,2 g Na_2SO_4 erreichte Anreicherung bzw. Reinigung, für Frischharn im 1-5 ppm Bereich bei hoher Detektorempfindlichkeit genügt; jedoch versagt diese Methode nach DONIKE (49) bei Frischharn bereits nach kurzer Lagerung ohne Kühlung, so daß die Anwendung für Material der forensischen Toxikologie in der Regel nicht möglich ist.

Für schwerflüchtige Stoffe ist eine parallel durchzuführende Aufarbeitung für eine dünnschichtchromatographische Prüfung unumgänglich.

Ein einfaches, zeitsparendes Anreicherungsverfahren für basische Stoffe beschreiben BASTOS u. Mit. (8). Sie isolieren durch Zusatz geringer Mengen Äthanol und anschließendes Aussalzen durch Zusatz von wasserfreiem K_2CO_3 bis zur Phasentrennung. Eiweißgehalt des Harnes erschwert die Abnahme der geringen Extraktmenge.

Neben Neutralstoffen und Basen enthält die Alkoholschicht auch Glukuronide, z.B. des Morphins. Die gewonnene Lösung muß auf Grund ihrer Beimengungen an Harnbestandteilen schon für die anschließende DC gereinigt werden. Dies geschieht durch Waschen der mit Äther verdünnten Lösung mit einem Puffer (pH 8,5). Hierbei werden u.a. die Glukuronide entfernt. Die gereinigte Äther/Alkohol-Phase mit den Basen wird mit Essigsäure eingengt und nach Aufnahme mit äthanolischer KOH auf Dünnschichtplatten aufgetragen. Es ist fraglich, ob diese Art der Anreicherung und Reinigung des Extraktes für stark gefärbtes Material ohne weitere Reinigungsschritte eingesetzt werden kann.

An wässrigen Lösungen wurden für die Amphetamine eine Ausbeute von 60-75 % vor, ca. 50 % nach der Reinigung erzielt. Bei einem Einsatz von 10 ml Harn konnten bei einer Konzentration von je 2 ppm Amphetamin, Chlorphentermin, Methamphetamin und Norephedrin bei einer Empfindlichkeit der anschließenden Dünnschicht-Detektion von $1 \mu\text{g}$ positive Resultate erzielt werden.

2.1.2. Adsorption

Aufbauend auf der Arbeit von DOLE u. Mit. (47), die die Verwendung von Kationenaustauscherpapier zur Anreicherung von Medikamenten in die toxikologische Analyse einführten, entwickelten sich einige weitere Anreicherungsvarianten. DOLE u. Mit. adsorbieren aus 50-100 ml Harn, den sie zur Reduzierung der Störung durch Harnbestandteile mit der gleichen Menge Wasser verdünnen, bei pH 5-6 an Amberlitepapier IR 120. Das gewaschene Papierstück wird sukzessive mit Puffern von pH 2,2; 9,3 und 11,0 mit Chloroform, Chloroform/Isopropanol (3:1) und nochmals mit Chloroform extrahiert. Dem pH 11-Extrakt mit den Amphetaminen und den anderen Sympathicomimetika wird 5 μ l Eisessig beim Abdunsten zugesetzt. Der trockene Rückstand wird in Methanol gelöst zur DC appliziert. Eventuell enthaltene Konjugate können auf dem Papier vor der Extraktion durch Inkubation mit Fermenten gespalten werden.

MULÉ (96) prüft von dieser Arbeit ausgehend mit radioaktiv markierten Substanzen die Ausbeuteverhältnisse unter Beibehaltung der pH-Werte. Als Vergleich diente die Direktextraktion (für Amphetamin bei pH 11 mit Chloroform). Jedoch fügte er vor dem Einengen der Lösungen 50 μ l Eisessig zu, um Abdunstverluste zu vermeiden. (Acetate und Formiate sind jedoch nach CLARKE 36 ebenfalls flüchtig). Er erzielte dabei für Amphetamin unter Einsatz von Ionenaustauschern eine Ausbeute von 2 %, während bei der Direktextraktion 61 ± 21 % gefunden wurden (Substanzbereich 1-20 μ g). Bei der Isolierung mit Ionenaustauschern mußten 10 μ g/ml Amphetamin in 50 ml Harn erreicht werden, um bei einer Erfassungsgrenze von 5 μ g einen positiven Nachweis zu erlangen. Bei Ephedrin und Phenmetrazin versagte das Verfahren völlig.

Es erstaunt demnach nicht, daß die Untersuchung des Harnes sogar nach Einnahme von 15-30 mg Amphetamin bzw. Methamphetamin nach dieser Methode negativ verlief, während bei Direktextraktion positive Resultate bei der DC-Prüfung erzielt wurden.

MONTALVO u. Mit. (94) fanden nach der Austauschermethode für Amphetamin eine Grenzkonzentration von 8 μ g/ml bei 50 ml Einsatz (Gesamtmenge 0,4 mg).

Wie MULÉ (96) bestätigten auch HEATON u. BLUMBERG (72) sowie BASELT u. CASARETT (7) bei geringen Mengen die schlechten Ausbeuteverhältnisse für Amphetamine in den pH 11-Reextrakten und somit falsche negative Resultate. Bei geringen Mengen fanden HEATON u. BLUMBERG (72) das Amphetamin teilweise in den bei pH 9,3 gewonnenen Extrakten wieder.

KAISTHA u. JAFFE (77) kamen beim Vergleich der direkten Extraktionsmethode mit der Kationenaustauschertechnik, die sie unter den Reextraktionsbedingungen des Papiers pH 10,1 CHCl_3 /Isopropanol (3:1) durchführten, für die Amphetamine zu etwa gleichen Grenzkonzentrationen von 0,5-1,5 μ g/ml. Während jedoch für die Austauscheranreicherung 50 ml verwendet werden, beträgt der Einsatz bei der Extraktion 15 ml Harn. Sie setzen beim Einengen der organischen Phase 50 μ l 0,5%iger H_2SO_4 in Methanol zu und dampfen zur Trockene ein. Bei der berichteten Verbesserung

der Ausbeuteverhältnisse für die Amphetamine lassen sich in bestimmten Analysenbereichen die Vorteile der Anreicherung durch Ionenaustauscherpapier ausnutzen. Die Adsorption an das Harz läßt sich in praktisch jeder Entnahmestelle durchführen (pH 5-7). Das beladene Papier kann bequem verschickt werden, ohne daß eine Beeinflussung bei höherer Temperatur und längerer Versanddauer befürchtet werden muß. Bei der Drogenüberwachung ist das Verfahren geeignet, den Sammelharn einer Person oder die beladenen Papiere der einzelnen Proben zusammen aufzuarbeiten. Die Aufarbeitung großer Harnmengen läßt sich so leicht bewerkstelligen.

Übereinstimmend betonen alle Autoren die Notwendigkeit der Überprüfung jeder Charge des Austauschermaterials hinsichtlich der Wiedergewinnungsraten. Für den Aufbau eines Gesamtanalysenganges reichen die niedrigen Ausbeuten sowohl der Amphetamine und anderer Basen als auch der Barbiturate nicht aus. Dies bestätigen die von den einzelnen Autoren angebrachten Ergänzungen durch Extraktionsschritte.

WEISSMAN u. Mit. (142) trennen Medikamente im Harn (5 ml) durch Behandlung mit Amberlite XAD-2 (für unspezifische Adsorption) ab. Dabei lassen sie den Harn in kleinen Säulen auf das Harz einwirken. Es wird mit Wasser nachgewaschen, möglichst trocken gesaugt und einmal mit Methanol (10 ml) eluiert. Nach dem Einengen wird mit wenig Methanol aufgenommen. Der Extrakt ist stark gefärbt, so daß für die DC nur Teile der Lösung verwendet werden können. Nach dieser Methode konnte bei Einsatz von 20 µg Amphetamin 90 % wiedergefunden werden. Es wird eine Erfassungsgrenze von 2 µg/5 ml für Amphetamin angegeben.

In Verbindung mit einem DC-System (43) soll die Aufarbeitung eine wirk-same Screeningmethode darstellen. Inzwischen haben die Autoren eine Reinigungsprozedur vorgeschlagen. Dabei sollen Extrakte nach dem Verdünnen mit Chloroform mit wässrigen Puffern behandelt werden. Dadurch soll es möglich sein höhere Aliquote einzusetzen, um auch niedrige Konzentrationen bei größerem Probeneinsatz zugänglich zu machen. Es soll dabei für Amphetamin eine Nachweisgrenze von 2,5 µg/10 ml Harn erreicht werden. Trotz Einengung bis zur Trockene im Stickstoffstrom bei 45° werden im Gegensatz zu anderen Quellen keine Ausbeuteminderungen an flüchtigen Basen beobachtet.

MULÉ u. Mit. (98) bestätigen die Anwendbarkeit der von WEISSMAN u. Mit. (142) beschriebenen Anreicherung durch Adsorption an Amberlite XAD-2 und anschließender Elution. Als großen Vorteil betrachten sie die Möglichkeit eines beachtlichen Probendurchsatzes bei einfachster Handhabung (bis zu 1000 Stück täglich).

Bei einer Probengröße von 25 ml wird für Amphetamin eine Wiedergewinnungsrate von 49 % (bei 50 µg Gesamteinsatz) mit H³-markierter Substanz bestimmt. Die Elution vom Säulenmaterial erfolgt dabei mit Chloroform/Isopropanol 3:1 und Zusatz gesättigter NaHCO₃-Lösung. Als Erfassungsgrenze werden bei angeschlossener Dünnschichtchromatographie 0,5 - 1,0 µg/ml für Amphetamin und Methamphetamin und 3,0 µg für Methylphenidat angegeben.

Ein inzwischen kommerziell erhältliches Instrumentarium zur einfachen Analyse von Harnen im Rahmen der Drogenüberwachung nach obiger Methode bringt die Firma BRINKMANN Instrument Inc.^{+) auf den Markt. Die Elution erfolgt mit einem Gemisch 1,2-Dichloräthan/Äthylacetat (4:6), das nach (98) geringe Wiederfindungsraten, z.B. für Morphin, bringt. Als anschließende Nachweismethode wird die DC nach DAVIDOW u. Mit. (43) empfohlen.}

2.1.3. Destillation

GOLDBAUM u. DOMANSKI (64) beziehen in ihre für Basen vorgeschlagene Aufarbeitung auch Amphetamin, Phenmetrazin und Ephedrin mit ein. Sie unterwerfen nach vorausgegangener basischer Ätherextraktion (mit dem 5fachen Volumen an Äther) und Reextraktion mit 0,5 N H₂SO₄ die wässrige Phase nach Zusatz von Natriumhydrogencarbonat der Wasserdampfdestillation. Es werden dabei in eine Vorlage mit einem Tropfen 1 N H₂SO₄ 4 ml Wasser überdestilliert. Es erscheinen in dieser Fraktion u.a. auch Phenothiazine und viele Antihistaminika. Das Destillat enthält z.B. 90 % des eingesetzten Amphetamins. Die nicht wasserdampfgefährliche Gruppe der Basen wird durch Extraktion des Rückstandes erfaßt. Einige Substanzen, wie z.B. die Tropanalkaloide, werden bei der Aufarbeitung zerstört. Die anfallenden Extrakte werden UV-spektrophotometrisch und gaschromatographisch geprüft.

BRANDENBERGER u. HELLBACH (26) destillieren flüchtige Basen direkt aus dem alkalisierten Untersuchungsmaterial und extrahieren anschließend das basische Destillat.

2.1.4. Derivatebildung

MACHATA (87) und EL GENDI u. Mit. (56) vermeiden Ausbeuteverluste, die bei der Extraktion auftreten, indem sie die Basen mit Tetraphenylborat fällen und den Niederschlag in Aceton gelöst zur DC einsetzen. Die Komplexe werden dabei wieder zerlegt. Sie können auf diese Weise die Ausbeute für Methamphetamin auf 88 % steigern, während die Extraktion vorher 45 % erbrachte. Allerdings muß als Vorbereitung des Harnes nach Einengen mit Aceton oder Alkohol gefällt werden; nach erneutem Einengen des Filtrates und Aufnehmen des Rückstandes mit Wasser wird Tetraphenylborat zugegeben.

Eine weitere Anreicherung über Bildung von Derivaten im Harn stellt die von WEISCHER u. OPITZ (141) für die Phentermin-, Chlorphentermin- und Fenfluraminbestimmung übernommene Bildung der 2,4-Dinitrophenyl-Derivate von Aminen dar. Nach der Reaktion wird mit Cyclohexan extrahiert.

^{+) Vertrieb Firma Macherey & Nagel, Düren}

Diese Methode hat den Vorteil, daß bei der anschließenden Dünnschichtchromatographie die Substanzen nicht angefärbt werden müssen; es zeigt sich jedoch, daß viele Nebenprodukte in Erscheinung treten. Die Methode war ursprünglich zur Bestimmung der Gesamtamine im Harn entwickelt worden. Die Autoren wenden das Verfahren zur quantitativen Verfolgung der Ausscheidung obiger Substanzen an. Die dünnschichtchromatographische Auftrennung der Derivate scheint dabei schwierig. Eine Möglichkeit der GC-Auftrennung wird nicht angeführt.

Die von ALFES u. CLASING (1) und CLASING u. Mit. (38) vorgeschlagene Überführung der extrahierten Amine in Derivate des 5-Dimethylaminonaphthalinsulfonsäure(1)-chlorid (Dansylchlorid) bzw. des 7-Chlor-4-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazol (NBD) erniedrigen zwar die DC-Nachweisgrenze enorm, erfassen jedoch tertiäre Amine nicht. Störungen durch Nebenprodukte bzw. reagierende Harnbestandteile und Reagenzüberschuß treten auf. Gaschromatographische Verfahren sind nicht einsetzbar. Die dünnschichtchromatographische Auftrennung der Derivate ist möglich (MÖLLMANN u. Mit. 93). Von der gleichen Arbeitsgruppe wurde Massenspektrometrie und, nach Einsatz von Mikrotechniken, Kernresonanz- und Infrarotspektrometrie zur Identifizierung der Derivate vorgeschlagen. Die Stärke dieser Methode - bei einem für Serienanalysen tragbaren Aufwand - liegt in der quantitativen und qualitativen Verfolgung der Ausscheidungsverhältnisse von Substanzen aus der erfaßten Gruppe. Die Erfassungsgrenze des Dansyl-Amphetamins wird bei der DC mit 2 ng angegeben.

BASELT u. CASARETT (7) extrahieren einen Probenanteil von 5 ml nach Isolierung der sauren Stoffe bei pH 11 mit 25 ml Chloroform in einer Einzelverteilung. In der getrockneten Chloroformschicht werden durch Zusatz von Essigsäureanhydrid die N-Acetyl-Derivate der primären und sekundären Amine erzeugt und nach dem Einengen gaschromatographisch getrennt. In einem parallelen Ansatz wird nach der Ionenaustauschertechnik auf weniger flüchtige Basen aufgearbeitet. Die Nachweisbarkeit von tertiären flüchtigen Basen, wie z.B. Dimethylamphetamin, dürfte unsicher sein.

Auch SCHWEITZER u. FRIEDHOFF (123) benutzen die Umsetzung mit Essigsäureanhydrid. Sie arbeiten zwei Proben parallel auf, denen sie wechselnde Mengen an β -Phenyläthylamin als inneren Standard zusetzen. Nach ihrer Methode liegt die Wiedergewinnungsrate für Amphetamin bei $103 \pm 13 \%$.

2.2. Verfahren zum Nachweis und zur Identifizierung

2.2.1. Dünnschichtchromatographie

Wie in fast allen analytischen Bereichen fand die Dünnschichtchromatographie (DC) auch beim Nachweis basischer Dopingmittel weite Verbreitung. Papierchromatographische Verfahren zum Nachweis zentralstimulierender Substanzen, z.B. nach POHLOUDEK-FABINI u. KÖNIG (110) und FREUNDT u. SCHWINGER (61) haben wegen des höheren Substanz- und Zeitbedarfs heute keine Bedeutung mehr.

2.2.1.1. Trennsysteme

Für die bevorzugt verwendeten Kieselgelschichten fanden sowohl saure als auch neutrale und basische Mischungen Verwendung. NOIRFALISE (103, 104) verwendet statt der von VIDIC u. SCHÜTTE (135) vorgeschlagenen wasserfreien 0,1 N NH_3 -Lösung in Methanol die bequemer zu handhabende Mischung Methanol/ NH_3 25 % 99:1. Diese Entwicklerflüssigkeit hat weite Verbreitung gefunden ebenso wie die in den gleichen Arbeiten erwähnten Mischungen Aceton/ NH_3 25 % 99:1 und Methanol/Chloroform 1:1. Für die Auftrennung der Sympathicomimetika bewährten sich auch die Fließmittel Chloroform/Diäthylamin 9:1 und Chloroform/Aceton/Diäthylamin 5:4:1 aus dem DC-Trennungsgang für Basen nach WALDI u. Mit. (137) sowie das von DEBACKERE u. MASSART-LEEN (45) eingeführte Gemisch n-Butanol/Essigsäure/ H_2O 5:4:1. MOERMAN (92) führte die Entwickler Methanol/Aceton 1:1 und Methanol/Aceton/ NH_3 25 % 47,5:47,5:5 in die Dopnganalyse ein. BÄUMLER u. Mit. (9) verwenden Methanol/Aceton/Triäthylamin 50:50:1,5. Das von RISTIC u. THOMAS (118) zur Auftrennung von Wirkstoffen aus *Catha edulis* benutzte Isopropanol/ NH_3 5 % 10:1 hat sich auch für die Trennung anderer Basen bewährt. WIENERT (145) erarbeitet für die Trennung von Sympathicomimetika die Laufmittel Chloroform/Äthanol/ NH_3 25 % 90:10:0,5, Chloroform/Methanol/ NH_3 25 % 10:90:2,5 neben 40:60:1 und Benzol/Äthanol/Ammoniak 25 % 30:70:1. DAVIDOW u. Mit. (43) trennen alle Arzneistoffe einschließlich Sympathicomimetika in Äthylacetat/Methanol/ NH_3 25 % 85:10:5.

Während WALDI (136, 137) zur Trennung von Phenyläthylaminderivaten auf Aluminiumoxidschichten Cyclohexan/Chloroform/Essigsäure im Verhältnis 45:45:10 und 60:30:10 einsetzt, trennen BÄUMLER u. Mit. (10) in der Mischung Chloroform/Toluol 1:1 (NH_3 -gesättigt). Die von NOIRFALISE (103) angegebene Mischung Chloroform/Methanol 1:1 wird sowohl für Kieselgel als auch für Aluminiumoxidplatten verwendet.

HEYNDRICKX u. DE LEENHEER (74) setzen gemischte Schichten aus Zellulose und Kieselgel und als flüssige Phase Chloroform/Aceton/ NH_3 25 % 50:50:1 ein. Sie erzielen damit besonders stabile Schichten.

RÖDER u. Mit. (119) trennen eine Reihe von Verbindungen aus der Palette der Psychopharmaka, darunter auch Amphetamin und weitere in der Dopinganalyse berücksichtigte Stoffe, an Kieselgel G-Schichten, die mit 0,1 N Na_2CO_3 -Lösung hergestellt wurden. Als flüssige Phasen werden die Azeotrope Methanol/Aceton 12:88, Äthanol/Tetrachlorkohlenstoff 16:84, Methanol/Beizol 31,7:68,3, Äthanol/Toluol 68:32 und Methanol/Cyclohexan/Methylacetat 17,8:33,6:48,6 bei Kammersättigung verwendet.

Bei diesem Verfahren erwähnen die Autoren den Vorteil der Langzeitkonstanz der Fließmittelzusammensetzung. Es können bis zu 10 Platten nacheinander entwickelt werden.

CARTONI u. CAVALLI (34) setzen n-Butanol/Ameisensäure/ H_2O 20:1:2 für ein DC-Screeningverfahren auf Zelluloseschichten ein. Jedoch liegen die gewählten Beispiele Amphetamin, Methamphetamin, Äthylamphetamin, Phenmetrazin und Phendimetrazin praktisch in einer Höhe, so daß die durch den Rf-Wert gegebene Information verloren geht.

2.2.1.2. Detektionsmittel

Zur Detektion der Sympathicomimetika werden neben Fluoreszenz bzw. Fluoreszenzlöschung bei Plattenmaterial mit Indikatorzusatz Farbreaktionen eingesetzt, wie sie auch für einen allgemeinen Basennachweis Verwendung finden. Geringfügige Variationen von Laufmittel und Plattenmaterial scheinen nicht geringen Einfluß auf die Sensitivität zu haben und den Mehraufwand zu rechtfertigen.

Das Reagenz nach DRAGENDORFF mit seinen Variationsmöglichkeiten wird von sehr vielen Autoren herangezogen (9, 10, 17, 43, 44, 96, 103, 107, 119, 142, 145). Weite Verbreitung fand in der Dopinganalyse auch Kaliumjodoplatinat (8, 17, 43, 47, 56, 72, 77, 87, 96, 97, 103, 104, 142, 145). Da beide Reaktionen für Amphetamin und Ephedrin relativ unempfindlich sind, werden häufig die noch unspezifischere Reaktion mit Ninhydrin (8, 43, 47, 52, 77, 96, 97, 107, 142, 145) und diazotiertes p-Nitranilin nach WICKSTRÖM u. SALVESEN (144) eingesetzt (10, 17, 107). Auch Echtschwarz und Echtblau mit anschließender Behandlung mit Natronlauge werden verwendet (53, 54). Neben Natrium-naphthochinon-4-sulfonat (10) und 2,4-Dinitro-chlorbenzol (107) werden Bromkresolgrün (34, 72), Benzochinon (107, 145), p-Dimethylaminobenzaldehyd (8, 9, 103, 145), Cer (IV)-sulfat (145), Phenothiazoniumbromid (107), das sehr empfindliche aber unspezifische Chlorbenzidinreagenz nach VIDIC 133 (56, 87, 107) und Chinhydrin (107) als brauchbar erkannt.

Es fehlt nicht an Versuchen, die aus einem Chromatogramm gewonnene Information durch konsekutives Besprühen mit mehreren Reagenzien beträchtlich zu erhöhen. So wird z. B. Ninhydrin oder Bromkresolgrün vor Dragendorff und Plateatreagenz (72) gesprüht oder nach der Dragendorff-Reaktion zusätzlich Plateat aufgebracht (107). Nach HEYNDRIX u. DE LEENHEER (74) ist auch diazotiertes p-Nitranilin nach Bromkresolgrün anwendbar.

DEBACKERE u. LARUELLE (44) differenzieren mit Dragendorff-Reagenz, das vor und nach der mit Silbernitrat gesättigten 10%igen Schwefelsäure (für Purine nach HAUCK 68) aufgesprüht wird. MULE (96) sprüht nacheinander Ninhydrin, 0,5%ige Schwefelsäure zur Intensivierung, Jod 1 % in Methanol, 0,5%ige Schwefelsäure und Jodplateat. BASTOS u. Mit. (8) versuchen in zwei Sprühsequenzen eine funktionelle Detektion zu erreichen. Während bei der ersten Reihe nach Ninhydrin in Aceton (primäre Amine), Einstellen in eine Schwefelkohlenstoff-Ammoniak Atmosphäre und Sprühen mit Kupfer (II)-chlorid-Lösung (sekundäre Amine), Jodplateat (tertiäre Amine) mit anschließender HCl konz. und schließlich p-Dimethylaminobenzaldehyd folgt (primäre aromatische Amine und Indole), wird bei der zweiten Reihe Ninhydrin in essigsauerem Medium (sekundäre Amine) vor Jodplateat und diazotiertem p-Nitranilin (primäre Amine) gesprüht. Trotz der sehr subtilen Prozedur - einschließlich Verwendung bestimmter Plattenmaterials und nur bestimmter Fließmittel für die einzelnen Detektionsfolgen - ergeben sich jedoch Überlappungen der einzelnen Substanzgruppen, insbesondere wenn sehr unterschiedliche Mengen auftreten. Eine Beobachtungszeit bis zu 14 Stunden, wie z.B. nach dem Dimethylaminobenzaldehyd-Spray, schränkt die praktische Anwendbarkeit noch mehr ein.

2.2.2. Gaschromatographie (GC)

Bringt die Flüchtigkeit vieler sympathicomimetischer Amine bei der Anreicherung aus Proben geringer Konzentration Schwierigkeiten, so bietet sich wegen dieser Eigenschaft die gaschromatographische Untersuchung geradezu an. Neben der Prüfung des Gesamtextraktes als Screening (7, 17, 24, 48, 50, 126, 129) wird die GC zur weiteren Bestätigung bereits erzielter Ergebnisse eingesetzt, z.B. nach vorausgegangener Dünnschichtchromatographie. Neben der mehrmaligen Elution des unbesprühten Sorbens neben einem detizierten Leitgemisch beschreiben CARTONI u. CAVALLI (34) die Extraktion von Zellosoeschichten nach dem Besprühen mit Bromkresolgrün. Die Möglichkeit gaschromatographische Fraktionen auf DC zu übertragen (bei einem Verlust von 50 %) wird von BÄUMLER u. Mit. (10) als mögliche Variante beschrieben.

2.2.2.1. Gebräuchliche Trennsysteme

PARKER u. Mit. (108) trennen Sympathicomimetika auf mit 5 % Carbowax 20 M und 5 % KOH belegten Säulen bei Temperaturen bis 210°C. Wegen seiner guten Trennleistung für flüchtige Basen wird dieses Material unter geringer Variation bei zahlreichen Autoren beim Weckmittelnachweis benutzt (16, 17, 24, 126). BECKETT u. WILKINSON (19), LEBBE u. Mit. (83) und BECKETT u. BROOKES (12) verwenden Carbowax 6000 10 % und 2 % auf mit 5 % KOH imprägniertem Material. DONIKE (48, 50) sowie CARTONI u. CAVALLI (34) waschen lediglich das Trägermaterial mit 5 bzw. 10%-iger methanolischer Kalilauge. BROCHMANN-HANSEN u. SVENDSEN (28) trennen Vertreter der gleichen Stoffklasse auf QF1-0065 (einem Fluoralkyl-

siliconderivat mittlerer Polarität) und wenig polarem Se-30 1,15 %, während FALES u. PISANO (57) biologisch wichtige Amine bei einer Belegung von 4 % trennen. Unter Variation der Belegung und des Trägers werden Säulen mit Se-30 wegen ihrer weiten Einsatzbarkeit auch in der Dopinganalyse verwendet. Meist wird eine Belegung von 2,5 % gewählt, z.B. bei BECKETT u. Mit. (17), STEELE u. Mit. (126). BROOKS u. HORNING (29) und CAPELLA u. HORNING (33) trennen biologisch aktive Amine, darunter auch Phenyläthylamine, nach der Acetylierung auf einer Mischung aus 7 % Siliconöl F 60 und 1 % EGSS-Z (einem Äthylenglykolsuccinat-phenylmethylsiloxan Copolymerem).

BÄUMLER u. Mit. (10) ermitteln aus einer Reihe von flüssigen Phasen, darunter auch Polyglykol- und Silicongummitypen, Polyäthylenimin in 5%iger Belegung auf Chromosorb P als für die Trennung der Amphetamingruppe am besten geeignet. LEBBE u. Mit. (83) benutzen für die Dopinganalyse Apiezon L als Trennflüssigkeit. Es wird in 5-10%iger Belegung auf alkalisiertem Trägermaterial eingesetzt (12, 34, 126). Zur Reduzierung des Tailings bringen DONIKE u. Mit. (50) neben 10 % Apiezon L 2 % Igepal CO-880 (einen Polyester) auf das mit 10%iger KOH gewaschene Chromosorb P auf.

Se-30 und Apiezon L lassen sich wegen ihrer Temperaturbeständigkeit auch für höhersiedende Stoffe einsetzen.

Meist werden zur Vermeidung von Adsorption und Zersetzung labiler Stoffe Glassäulen angewendet. STREET (129, 130) konnte jedoch zeigen, daß auch sehr kleine Mengen problematischer Substanzen in Stahlsäulen chromatographiert werden können, wenn sie entsprechend vorbereitet werden.⁺)

Silicongummiderivate und reine Apiezon L Säulen stehen im Verruf, zu erheblichen Tailing zu neigen. Diese Störung macht sich besonders nachteilig bemerkbar, wenn herunter bis in den ng-Bereich gearbeitet werden soll.

Die bei BECKETT u. Mit. (17) angeführten Arbeitstemperaturen und Säulen haben den Nachteil der niedrigen Analysenfrequenz und damit einen hohen Aufwand an Geräten zur Folge, wenn man die GC-Analyse für Screening und Identifizierung einsetzt.

Einen Fortschritt brachte die Möglichkeit, gut reproduzierbare Temperaturprogramme ablaufen zu lassen. ALFES u. Mit. (2) konnten an einer 1,5 % Se-30 Säule die breite Skala der damit erfassbaren zentralstimulierenden Arzneimittel zeigen. DONIKE (48) bestätigt dies und zeigt die Vorteile eines thermoionischen Detektors. Die Möglichkeit eine Schnellchromatographie mit 30° Temperaturanstieg pro Minute (Bereich von 138-275°) auf

⁺) Neben der Art der flüssigen Phase scheint die Präparation der Säule sehr wesentlich für die Trenneigenschaften zu sein, was den Vergleich der Ergebnisse verschiedener Laboratorien erschwert.

Apiezon L./KOH Material für reines Screening einzusetzen, beschreiben STEELE u. Mit. (126). Negative Proben können rasch ausgeschieden werden; positive können anschließend auf andere Säulen gegeben werden.

2.2.2.2. Derivatebildung

Es fehlte auch bei der Dopinganalyse nicht an Bestrebungen, neben dem Retentionsverhalten bei vorgegebenen Säulen weitere Informationen und damit höhere Aussagesicherheit zu erzielen. Eine Möglichkeit stellt dabei die Derivatisierung funktioneller Gruppen und die damit erzielte Änderung des Elutionsverhaltens auf der gleichen Säule dar (Peakshifttechnik).

Eine Übersicht der anwendbaren Derivatisierung zur weiteren Identifizierung und Bestätigung findet sich bei BECKETT u. Mit. (17). Unter anderem ergeben sich folgende Möglichkeiten:

1. Die Bildung Schiffscher Basen aus den primären Aminen mit Aceton. Dieses Verfahren wurde von BROCHMANN-HANSSEN u. SVENDSEN (28) in die Gaschromatographie eingeführt. Mit Ketonen höheren Molekulargewichtes erfolgt die Umsetzung in der Regel langsamer.
2. Die Umsetzung der primären Amine mit CS_2 in die Isothiocyanate. Auch BRANDENBERGER u. HELLBACH (26) wenden dieses Verfahren für die Dopinganalyse an. Durch die Reduzierung der Polarität ergeben sich besonders auf weniger polarem Trennmateriale (Se-30, Xe-60, OV-17, OV-225 und Apiezon) gut verwertbare, da symmetrische Peaks ohne Tailing. Die irreversible Adsorption auf der Säule wird weitgehend zurückgedrängt. NARASIMHACHARI u. VOUIROS (100) bestätigen die positiven Ergebnisse. Sie trennen die aus sekundären Aminen entstandenen Thiocarbaminsäuren mit Puffer ab. Das Verfahren hat den Vorteil, daß z.B. phenolische Gruppen anschließend noch in Trimethylsilylderivate überführt werden können.
3. Sekundäre Amine mit β -Hydroxygruppen lassen sich nach CAPELLA u. HORNING (33) mit Ketonen zu Oxazolidinen umsetzen. Dieses Verfahren wurde auch von BECKETT u. WILKINSON (19) angewandt.
4. Auch die aus sekundären Aminen mit cyclischen Ketonen, besonders mit Cyclopentanon, entstehenden Carbinolamine eignen sich zur Gaschromatographie (33).
5. Bei primären Aminen wie β -Phenyläthylamin erzielten CAPELLA u. HORNING (33) N-Trimethylsilylierung, jedoch ist die Umsetzung nicht quantitativ und nur in Abwesenheit eines Ketones durchführbar.
6. Die N-Acylierung von primären und sekundären Aminen zur Bildung z.B. der Acetylderivate nach BROOKS u. HORNING (29) ist ebenso möglich wie die Bildung der Propionyl- und Heptafluorobutyrylderivate (BRUCE u. MAYNARD 30). Trichloracetylverbindungen finden ebenso Verwendung wie Trifluoracetyl- (ANDERS u. MANNERING 3 und NARASIMHACHARI u. VOUIROS 100) und Tribromacetylderivate (10).

In der Regel sind die bereits verwendeten apolaren Trennmaterialien für die erzielten Verbindungen gut einsetzbar. Voraussetzung für die Verwendungsmöglichkeit einer Derivatebildung ist, daß es gelingt, die Reaktion in vertretbarer Zeit möglichst quantitativ durchzuführen.

Während bei den Aceton- und Senfölderivaten der primären Amine die getrockneten, eingeeengten Ätherextrakte oder Teile davon mit Überschuß an Reagenz aufgenommen und zum Teil wieder eingeeengt werden (17, 26, 28), mischt STREET (129) äthanolische Lösungen des Extraktes und Reagenz in der Spritze, was den Einsatz kleinster Mengen für die Derivatisierung erlaubt. Die Extraktmenge soll dabei optimal ausgenützt werden. Bei den Acylderivaten ist es möglich, den Extrakt und sofort nachfolgend das Reagenz, besonders Essigsäure- und Propionsäureanhydrid, zu injizieren (3, 126). Neben N-Acylierung wird dabei auch die Umsetzung aller OH-Gruppen erzielt. Nach BECKETT u. Mit. (17), die im Extrakt mit Essigsäureanhydrid umsetzen, bewirken die anwesenden Spuren von Wasser, daß nur N-Acylierung eintritt. STREET (130) nutzt die Umsetzung mit Benzaldehyd nach Injektion eines Gemisches aus Extrakt und Reagenz aus. Ephedrin reagiert dabei wie ein primäres Amin. Phentermin und Chlorphentermin, die keine Schiffschen Basen mit Aceton bilden (17), reagieren bei Verwendung von Benzaldehyd auf der Säule.

2.2.2.3. Variation des Detektors

Neben oder zusätzlich zur Peakshifttechnik bietet sich die mit verschiedenem Aufwand zu betreibende Varianz des Detektors an.

BRANDENBERGER u. HELLBACH (26) nützen neben der Veränderung der Retentionszeit durch die Derivatisierung die Anwendbarkeit des Elektroneneinfangdetektors (EED) beim Nachweis des Amphetaminisothiocyanats aus. Der Detektor eignet sich auch für die empfindliche Anzeige der Halogenacylderivate. Durch die erwähnte Überführung in die Heptafluorbutyryl-derivate und Einsatz eines EED gelingt es BRUCE u. MAYNARD (30) bei Amphetamin, Methamphetamin, Chlorphentermin und Fenfluramin im Bereich von 20-100 ng/ml zu arbeiten.

BÄUMLER u. Mit. (10) führen die Bildung von N-Acetylverbindungen mit Bromacetylchlorid für den Einsatz des Halogenphosphordetektors (HPD) durch und erzielen damit eine empfindliche, gruppenspezifische Anzeige. Daneben werden die Bromacetyl-derivate mit DC-Methoden getrennt. Der thermoionische Detektor unter Einsatz eines Rubidiumbromidkristalles[†], auch als Stickstoffdetektor (Firma Hewlett-Packard, Böblingen) vertrieben, wird vor allem von DONIKE (48, 50) für die Dopingsanalyse eingesetzt. Bei Einsatz von frischem Material erlaubt die Selektivität und hohe Sensitivität eine weitgehende Reduzierung der Aufarbeitung wie unter 2.1.1. erwähnt. Diese Aufarbeitung ermöglicht den Einsatz automatischer Proben-

[†]) Andere Firmen stellen ihre thermoionischen Detektoren mit Rubidium-sulfat bzw. -chlorid aus.

geber und programmierten Analysenablauf für die flüchtigen Substanzen. Für die übrigen Gruppen muß jedoch nach wie vor aufgearbeitet und angereichert werden. Direktinjektion der Harnprobe ist im Dauerbetrieb nicht möglich. DONIKE u. Mit. (50) erreichen nach Optimierung mit einem etwas variierten Detektor eine Nachweisgrenze von 10 pg (am gleichen Gerät für den FID 100 pg). Es darf jedoch angezweifelt werden, daß es sich hierbei um den Empfindlichkeitsbereich des Dauerbetriebes handelt.

Die Optimierung derartiger Detektoren, vor allem bei häufigem Säulenwechsel, ist durch die Zahl der zu variierenden Parameter noch problematisch und langwierig. Die von den Firmen gegebenen Optimierungsanweisungen sind meist zu ungenau (v. MEYER 91); dies kann durch eigene Versuche bestätigt werden. Bei den bisher kommerziell erhältlichen Geräten treten auch nach dem Optimieren erhebliche Störungen auf, z. B. durch Luftdruckschwankungen (Öffnen einer Labortüre oder Passieren einer Person am Detektor).

BONNICHSEN u. Mit. (24) gelingt es durch Kopplung Gaschromatographie-Massenspektrometrie (GC-MS) aus Blut von Kraftfahrern bis herunter zu einer Gesamtmenge von $2 \mu\text{g}/9 \text{ ml}$ Blut (0,22 ppm) Amphetamin nachzuweisen. Ohne Harnprobe war jedoch dann eine zwingende Identifizierung nicht mehr möglich.

BRANDENBERGER (25) gelingt nach Überführung von Amphetamin mit CS_2 in das Isothiocyanat noch im 10-20 pg-Bereich pro Injektion in den GC - bei Vorwahl bestimmter Massenzahlen - ein positiver Nachweis. Er nennt dieses Verfahren der Einstellung charakteristischer Massenfragmente, die in einem bestimmten Verhältnis auftreten müssen, "massenselektive Detektion" (MSD). Obwohl das Detektorsystem noch in der Lage wäre, auch geringere Mengen anzuzeigen, setzt die irreversible Adsorption im GC-System die Grenze. BONNICHSEN u. Mit. (24) sowie BLOMQUIST u. Mit. (23) berichten jedoch auch über Fälle aus der Praxis, bei denen mit der Retentionszeit des Amphetamins und des Phenmetrazins auftretende Substanz-Peaks bei Einsatz der MS nicht geklärt werden konnten. Zur Auswertung der Gesamtspektren wurde dabei auf Computer zurückgegriffen.

Es wird nicht berichtet, inwieweit das Verfahren für altes Probenmaterial anwendbar ist.

Bei der GC-MS Kopplung macht sich der Vorteil mancher Derivate wie z. B. der Isothiocyanate neben der durch die Peakshifttechnik erreichten Information in der Erzielung eines hohen Molekularpeaks bemerkbar, der bei den freien Basen fehlt (25, 100).

Es darf jedoch nicht vergessen werden, daß die massenselektive Detektion mit ihrem enormen technischen Aufwand zwar für Bestätigungsanalysen flüchtiger Verbindungen hohe Empfindlichkeit und Spezifität aufweist, für ein allgemeines Screeningverfahren aber nicht einsatzfähig ist. Obwohl die Massenspektrometrie als absolutes Verfahren zu betrachten ist, gelingt eine rasche, sichere Identifizierung mit vertretbarem Aufwand nur, wenn bereits Vergleichsunterlagen über die Fragmentierung vorliegen.

2.2.3. UV-Spektrophotometrie

Einige Autoren (9, 44, 56, 74, 87, 133) setzen UV-Spektrophotometrie zur Identifizierung von Weckmitteln ein. WARREN u. Mit. (140) bringen ein System, das die Einordnung von Amphetaminen, Ephedrin und chemisch verwandte Substanzen in einzelne Gruppen erlaubt.⁺⁾ Eine Unterscheidung innerhalb der einzelnen Gruppen, z.B. der Amphetamine ist jedoch nicht möglich.

Die für eindeutige Aussagen unerlässliche Reinigung und Auftrennung der Extrakte in Einzelsubstanzen ist nicht zu umgehen; sie erfolgt meist dünn-schichtchromatographisch. Nach MACHATA (87) ist die Extraktion auch nach der Reaktion mit Plateatreagens möglich. Wegen der geringen Absorption bei Wellenlängen >230 nm sind relativ konzentrierte Lösungen oder der Einsatz von Mikroküvetten zur Erhöhung der Schichtdicke nötig.

GOLDBAUM u. DOMANSKI (64) prüfen bei ihrer Basenaufarbeitung die erhaltenen schwefelsauren wässrigen Lösungen auf ihre UV-Adsorption und unterteilen danach in Substanzgruppen. Wegen der geringen Extinktionskoeffizienten bei Wellenlängen >240 nm dient der steile Anstieg der Absorption bei 220 nm als Hinweis auf Stoffe aus der Gruppe Amphetamine, Ephedrine und Phenmetrazin.

WALLACE u. Mit. (138) erzielen höhere Empfindlichkeit durch Oxydation der extrahierten Amphetamine mit Cer(IV)-sulfat und anschließender spektrophotometrischer Auswertung. Die Anwendbarkeit der Methode auch auf andere Substanzklassen (WALLACE u. LADD 139) läßt nur bedingte Spezifität und damit Störanfälligkeit erwarten.

2.2.4. IR-Spektrophotometrie

Wegen ihrer hohen Aussagekraft wurden IR-Spektren auch zur Identifizierung von Dopingsubstanzen herangezogen (9, 17). WARREN u. Mit. (140) identifizieren Stoffe aus der Amphetaminreihe durch ihre bei IR-neben UV- und Kernresonanzspektrometrie gewonnenen Daten. Mikromethoden erlauben den Einsatz bis in den μg -Bereich (BRANNON 27, HAYDEN u. Mit. 71, KLEIN 78, KLEIN u. ULBERT 79 sowie MASON 90). Die Auftrennung und Gewinnung ausreichend reiner einzelner Substanzen, erfordert besonders bei Anwendung auf biologisches Material meist mehrere Reinigungsschritte. Die Langwierigkeit der Reinigung und Aufnahme der Spektren sowie die Schwierigkeit der Auswertung stehen der breiten Anwendung der Methode mehr entgegen als der Substanzbedarf.⁺⁺⁾

^{+) Die Methode wird nur an Reinsubstanzen erprobt.}

^{++) BECKETT u. Mit. (17) geben z.B. 50-100 μg an.}

2.2.5. Massenspektrometrie

Wie bereits unter 2.2.2.3. behandelt, gewinnt die an die Gaschromatographie gekoppelte Massenspektrometrie zunehmend an Bedeutung bei der Identifizierung der durch die Gaschromatographie erfaßbaren Substanzen und damit auch der flüchtigen Dopingmittel. Da bei den neueren mit der GC gekoppelten Geräten auch die Möglichkeit der Direkteingabe besteht, können mit der gleichen Einrichtung auch gaschromatographisch nicht trennbare Substanzen nach Vorreinigung (z. B. DC) eingebracht werden. ALFES u. CLASING (1) beschreiben die Möglichkeit, die zu untersuchende Zone des Sorbens ohne Elution zu verarbeiten, wobei aber die Qualität der Spektren beeinträchtigt wird. Der gleiche Arbeitskreis wendet dieses Verfahren für die NBD- und Dansyl-Derivate an. Die Bestätigung der Anwendbarkeit des Verfahrens für die Routineanalyse steht jedoch noch aus.

2.2.6. Kernresonanzspektrometrie

Da heute auch für die NMR-Technik Mikromethoden unter Verwendung elektrischer Speichergeräte zur Verfügung stehen, halten WARREN u. Mit. (140) dieses Verfahren für eine wertvolle Ergänzung bei der Identifizierung der Amphetamine und verwandter Substanzen. ALFES u. CLASING (1) setzen die Kernresonanzspektrometrie zur Identifizierung der Dansyl-Derivate ein. Der gleiche Arbeitskreis (CLASING u. Mit. 40) beschreibt die Möglichkeit, das Verfahren auch für die NBD-Derivate anzuwenden.

Mikrokristallreaktionen, wie sie z. B. VIDIC (133) anwendet und von FARMILLO u. GENEST (58) in großem Umfang bearbeitet wurden, haben wie Mikrofarbreaktionen, die z. B. bei RATHENASINKAM (117) und MACHATA (87) noch angewendet werden, ihre Bedeutung verloren.

2.3. Ergebnis der Literaturübersicht

In der Literatur werden zahlreiche Möglichkeiten des Nachweises einzelner der hier interessierenden Substanzen nach verschiedensten Methoden mit unterschiedlicher Sensitivität und Spezifität beschrieben. Diese Nachweismethoden sollten hier jedoch unberücksichtigt bleiben, wenn sie nicht für eine allgemeine Untersuchung anwendbar sind, da das einmalige, begrenzte Material den Einsatz von Testbatterien von Einzelnachweisen nicht zuläßt. Die gesichteten Arbeiten suchen durch eine Vielzahl an Methoden und Varianten den bestehenden Schwierigkeiten, besonders beim Nachweis basischer Dopingmittel, gerecht zu werden.

Einige Verfahren zeigen hinsichtlich der Substanzen umfassende Screeningmethoden mit wenig Identifizierungsmöglichkeiten. Dies gilt besonders für die bei der Überwachung und Erkennung Drogenabhängiger eingesetzten Methoden, die bei geringem apparativen Aufwand und einfacher Durchführung nur relativ große Mengen der fraglichen Substanzen nachzuweisen erlauben.

Einige der zitierten Arbeiten über die Dopinganalyse erzielen aus frischem Material z. T. höchste Empfindlichkeit und sichere Identifizierung für eine eng begrenzte Substanzauswahl. Der apparative Aufwand für die Durchführung zahlreicher Analysen in vertretbarer Zeit übersteigt dabei die Ausstattung auch größerer Laboratorien bei weitem. Es zeigt sich dabei, daß bisher - abgesehen von Demonstrationen der technischen Möglichkeiten, wie z. B. bei Olympischen Spielen - nur an Paradebeispielen, meist unter Zusammenarbeit mehrerer Institute, die theoretisch zur Verfügung stehenden Verfahren eingesetzt werden können. Die Prüfung auf schwerflüchtige Substanzen erfordert daneben nach wie vor zusätzliche Aufarbeitung mit hoher Anreicherung für DC-Systeme.

Der relativ hohe Zeitbedarf gaschromatographischer Methoden konnte durch die Entwicklung von Geräten mit Temperaturprogrammen erheblich reduziert werden. Sind Analysenverfahren in Screening und Identifizierung auf GC aufgebaut, ist durch die für eine Probe erforderliche Untersuchungen die Analysenfrequenz pro eingesetztes Gerät noch immer gering. Probenmaterial, das kurze Zeit unsachgemäß gelagert wurde (z. B. Transport ohne Kühlung), bringt für reine GC-Verfahren immense Schwierigkeiten, die auch durch Einsatz sogenannter "Stickstoffdetektoren" nicht beseitigt werden können.

Es war deshalb nötig, eine Aufarbeitung im Rahmen einer allgemeinen Arzneimittelanalyse zu entwickeln, die besonders für altes Probenmaterial anwendbar ist. Bei tragbarem Aufwand sollte in einem umfassenden Screening auch die Gruppe der flüchtigen Basen empfindlich erfaßt und der Nachweis anderer Substanzgruppen nicht beeinflusst werden. Die angeschlossenen Nachweisverfahren sollten eine sichere Identifizierung gewährleisten. Die Möglichkeit weitere Nachweisverfahren in den Analysengang einzubeziehen sollte dabei nicht eingeengt werden.

3. EIGENE UNTERSUCHUNGEN

Aus der für die Olympischen Spiele München 1972 gültigen Aufstellung der Dopingsubstanzen wird ersichtlich, daß es sich bei der überwiegenden Zahl der Substanzen um Basen handelt. Gerade jedoch bei der Analytik dieser meist flüchtigen basischen Arzneistoffe treten, wie die zahlreichen Veröffentlichungen mit ihren Versuchen zur Lösung zeigen, erhöhte Schwierigkeiten auf. Es galt deshalb besonders das Verhalten von flüchtigen basischen Wirkstoffen zu untersuchen und ihre Erfäßbarkeit, ohne Beeinträchtigung der sauren und neutralen Wirkstoffe sowie anderer Basen, zu gewährleisten.

Für die eigenen Untersuchungen wurde darauf geachtet, daß Substanzen verschiedener chemischer Gruppen sowohl der Stammverbindungen wie auch der funktionellen Gruppen in die Untersuchungen einbezogen wurden. Es wurde dabei eine möglichst weitgehende Vollständigkeit der üblichen Dopingsubstanzen angestrebt; jedoch wurden auch die am Institut für Gerichtliche Medizin, Freiburg, gemachten Erfahrungen über die Häufigkeit von gefundenen Dopingsubstanzen wertend berücksichtigt. Da die Methode generell einsetzbar sein soll, wurden auch einige Alkaloide und Psychopharmaka in die Untersuchungen mit einbezogen (Tab. 6).

3.1. Abtrennung und Anreicherung der Wirkstoffe aus wässriger Lösung in Form ihrer Hydrochloride

Der Vielzahl der unter 2.1. aufgeführten Verfahren zur Gruppentrennung und Anreicherung wurde ein abgekürzter STAS-OTTO-Trennungsgang nach WINTERFELD (146) mit dessen Hauptgruppen BI, BII und BIII vorgezogen. Auf eine Unterteilung in weitere Fraktionen wurde verzichtet. Wie z.B. auch VIDIC u. SCHÜTTE (135) zeigen, ist die Verteilung in den wenigsten Fällen hundertprozentig. Die bereits geringen Wirkstoffmengen werden dadurch noch auf mehrere Fraktionen aufgeteilt und gemindert. Bei der Betonung anschließender physiko-chemischer Verfahren, insbesondere der Chromatographie, wurde die gewählte Grobeinteilung für voll ausreichend zur Durchführung der Screening- und nachfolgenden Identifizierungsversuche gehalten.

Von den vorgeschlagenen organischen Lösungsmitteln wurde in erster Linie wegen des niedrigen Siedepunktes Diäthyläther⁺) als Extraktionsflüssigkeit gewählt. Auch bei den in der Regel vorliegenden geringen Kon-

⁺) Zur Zerstörung der Peroxide wurde nach HESSE u. Mit. (73) mit basischem Aluminiumoxid behandelt.

zentrationen sollten die Verteilungszahlen der zu analysierenden Substanzen ausreichen, um bei mehrfacher Extraktion mit größeren Mengen der organischen Phase, die leicht einzuengen ist, günstige Ausbeuten zu erzielen. Bei Verwendung von Äther unterbleibt im Gegensatz zu Chloroform die für manche Basen beobachtete Ionenpaarextraktion der Hydrochloride (129). Zum Alkalisieren wurde festes Natriumkarbonat verwendet.

Die Wirksamkeit der Extraktion mit Äther bestätigte folgender Versuch:

10 mg Dimethylamphetaminhydrochlorid werden in 50 ml Wasser gelöst. Nach dem Alkalisieren mit festem Na_2CO_3 (pH 11-12) wird dreimal mit 50 ml Diäthyläther im Scheidetrichter extrahiert. In den vereinigten Ätherextrakten lassen sich acidimetrisch nach einem in USP XV für die Amphetamin- bzw. Methamphetaminbestimmung angegebenen Verfahren über 90 % der eingesetzten Menge nachweisen.

Die beschriebenen geringen Wiederfindungsraten für die Amphetamine waren somit nicht auf eine ungünstige Verteilung bei der Abtrennung aus wässrigem Milieu zurückzuführen. Um bei dem notwendigen Einengen der Ätherextrakte (bis zur Trockene) Substanzverluste zu vermeiden, sollte, als einfachste und für alle Basen anwendbare Derivatebildung, vor dem Abdunsten Salzsäure in einem organischen Lösungsmittel den Extrakten zugefügt werden. Dabei sollten nur Spuren von Wasser auftreten, um gegen Ende des Einengens eine saure Hydrolyse durch azeotrope Salzsäure zu vermeiden. Eventuell im Extrakt enthaltene Neutralstoffe würden mit den nichtflüchtigen Hydrochloriden in einer Fraktion anfallen ^{†)}. Die Anwendbarkeit des Verfahrens wurde im folgenden geprüft.

3.1.1. Bestimmung der Wirksamkeit des gewählten Verfahrens

Als Vorversuch wurden zunächst gravimetrisch die Wiedergewinnungsraten bestimmt.

Methode: 10-100 mg Salz werden in 50 ml H_2O gelöst, mit H_2SO_4 (10 %) auf pH 1-2 gebracht. Es wird mit 50 ml Diäthyläther 5 Min. im Scheidetrichter geschüttelt. Die organische Phase wird abgetrennt und verworfen. Diese saure Extraktion wird zweimal wiederholt.

^{†)} UHLMANN (132) verwendet - allerdings bei den Untersuchungen von Arzneispezialitäten - 0,1 N Salzsäure bei der Abtrennung von basischen Suchtmitteln aus dem organischen Extrakt und dampft die saure, wässrige Lösung (20 ml) ein.

Die verbleibende wässrige Phase wird mit festem Na_2CO_3 alkalisiert (pH 11-12). Mit je 50 ml Diäthyläther wird dreimal durch 5minütiges Schütteln eine Verteilung durchgeführt. Die gesammelten Ätherextrakte werden über Natriumsulfat getrocknet und halbiert.

Eine Hälfte wird bei Raumtemperatur im Abzug vorsichtig eingedunstet und gewogen.

Die andere Hälfte wird tropfenweise mit methanolischer Salzsäure (Methanol:HCl konz. 99 + 1) versetzt bis eine Probe auf angefeuchtetem Indikatorpapier saure Reaktion zeigt. Anschließend wird bei Raumtemperatur abgedunstet. Die mit Salzsäure behandelten Extrakte werden nach dem Einengen eine Stunde bei 80° vor dem Wiegen getrocknet.

Bei den durchgeführten Versuchen wurden folgende Ergebnisse erzielt:

Tab. 1: Gravimetrische Ausbeuten bei der Abtrennung der freien Basen und der Salze

	(Mittelwerte in %)	
	ohne HCl	mit HCl
Methamphetamin	40	90
Amphetamin	30	95
Dimethamphetamin	38	98
Äthylamphetamin	30	102
Prophylhexedrin	27	88
Äthylephedrin	45	92

Obgleich bei dieser recht groben Bestimmung der freien Basen als Vergleich einerseits die Fehler durch Miterfassen von Kondenswasser, andererseits durch weiteres Abdunsten der Basen schwerlich zu vermeiden waren, gaben die erzielten Ergebnisse doch Anlaß, durch geeignetere Methoden die gefundenen Ausbeuteverhältnisse genauer zu prüfen.

Für Amphetamin bot sich die photometrische Bestimmung in den anfallenden Extraktückständen nach POHLOUDEK-FABINI u. KONIG (110) an. Dabei wird nach erfolgter Kupplung mit diazotiertem p-Nitranilin in stark alkalischem Milieu das gefärbte Endprodukt gegen einen Blindwert gemessen. Um möglichst geringe Mengen noch erfassen zu können, sollte das gefärbte Reaktionsprodukt mit n-Butanol aus der wässrigen Phase extrahiert werden (BEYER u. SKINNER 22). Es zeigte sich dabei, daß die erhaltenen Extrakte in ihren Extinktionswerten inkonstant waren, wobei

keine Gesetzmäßigkeit hinsichtlich des zeitlichen Ablaufes festzustellen war; dies war in erster Linie auf - auch in den Vergleichs- und Leerwerten auftretende - unkontrollierbare Trübungen zurückzuführen.

Es wurde deshalb auf die Eigenabsorption der Amphetamine im UV-Bereich zurückgegriffen und höhere Konzentrationsbereiche in Kauf genommen. Bei einer Konzentration von 0,18 mg pro ml in einem Puffer nach CLARK u. LUBS (USP XI) von pH 1,2 ergab sich am registrierenden Spektralphotometer R PQ 20 A¹⁾ der in Abb. 1 gezeigte Kurvenverlauf (Schichtdicke 1 cm). Die gefundenen Maxima entsprechen den bei CLARKE (37) angegebenen Werten.

Obwohl ein Parallelversuch am Einstrahlphotometer PMQ II¹⁾ eine höhere Ablesegenauigkeit zeigte, wurde zur Messung jeweils die Absorption von 280-240 nm registriert. Als Meßgröße wurde die Differenz der Extinktion 257-280 nm verwendet. Es konnten dabei Fehler, die den Kurvenverlauf beeinflussten, wie Substanzveränderungen und Verunreinigungen aus den verwendeten gefetteten Schliffgeräten oder Kontamination während des Abdunstens, leichter erkannt und daraus resultierende falsche Ergebnisse vermieden werden.

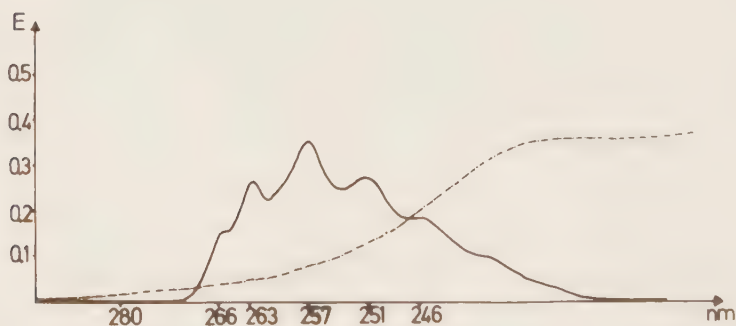


Abb. 1: UV-Spektrum des Amphetamins

— 0,18 mg Amphetaminsulfat, - - - - - basischer Extrakt
jeweils in Pufferlösung pH 1,2

Die Abbildung zeigt auch das Spektrum eines Extraktes, der mehrere Tage nach dem Abdunsten offen im Labor stand. Durch Verunreinigungen oder eine mögliche Veränderung der Substanz würde bei einer Ein-Punkt-

1) Firma Zeiss, Oberkochen

Messung im Maximum hierbei 0,5 mg Amphetaminsulfat pro 10 ml Puffer vorgetauscht. Der sich ergebende Kurvenverlauf läßt jedoch nur die Anwesenheit minimaler Spuren an unverändertem Material zu.

Es ergab sich nach der unten angegebenen Aufarbeitung eine Ausbeute für Amphetamin ohne HCl-Zusatz von 10-30 % der zugesetzten Menge je nach Dauer der Exposition des Extraktes bei Raumtemperatur, während sie nach HCl-Zugabe 90-100 % betrug. Bei Äthylamphetamin ließ sich von der eingesetzten Menge in den Extrakten mit HCl-Zugabe 80-105 % bestimmen.

Bei Erhöhung der Abdampftemperatur der angesäuerten Extrakte von 20° auf 60°C (Sandbad) ließ sich keine Verminderung der Ausbeuten feststellen; ebenso war es für die Amphetamine nicht nötig, die Extrakte mit Natriumsulfat zu trocknen, wenn bei höheren Temperaturen eingeeengt wurde. Dies vermeidet bei Anwesenheit von nur wenigen µg in großen Äthervolumina mögliche Absorptionsverluste, wie sie z.B. CAMPBELL (32) beobachtet. Als nachteilig machte sich die Tatsache bemerkbar, daß die Schalen mit den trockenen Extrakten schwer benetzbar waren. Beim Versuch, durch Erwärmen den Wirkstoff in die wässrige Phase zu bringen, können durch Verdunsten die Lösungen geringfügig eingeeengt werden und so die beobachteten zu hohen Ausbeuten verursacht werden.

Methode:

a) Erstellen der Eichkurven

Aus einer wässrigen Maßlösung mit 40 mg eines Salzes der betreffenden Base werden steigende Mengen (0,5-6 ml) abgenommen, mit Wasser auf 5 ml ergänzt. Nach dem Zufügen von 5 ml Puffer pH 1,2 nach CLARK u. LUBS wurde die Absorption von 280-240 nm gegen eine Puffer-Wasser-Mischung (1+1) gemessen. Die Extinktionsdifferenz $E_{257}-E_{280}$ diente als Meßgröße. Die Eichkurve stellt eine Gerade dar. Die Reproduzierbarkeit der Eichwerte betrug $100 \pm 2,5 \%$.

b) Extraktion

Ca. 15-50 mg eines Salzes werden genau gewogen und in 50 ml H₂O gelöst. Nach dem Ansäuern mit H₂SO₄ 10 % wird dreimal mit 50 ml Diäthyläther durch jeweils 5minütiges Schütteln im Scheidetrichter extrahiert. Die organische Phase wird verworfen.

Nach dem Alkalisieren der wässrigen Phase mit Natriumkarbonat (pH 9-10) wird in gleicher Weise dreimal mit 50 ml Diäthyläther ausgeschüttelt. Die gesammelten Ätherfraktionen werden auf 200 ml ergänzt. Aliquote, die 2,5 bzw. 5 mg des eingesetzten Salzes entsprechen, werden

1. nach dem Trocknen ohne Zusatz bei Raumtemperatur in Abdampfschalen abgedunstet,
2. getrocknet mit Na₂SO₄ bzw. ungetrocknet mit Methanol/Salzsäure (99+1 V/V) versetzt, bis eine Probe auf Indikatorpapier saure Reaktion zeigt. Auf dem Sandbad wird bei 30 bzw. 60° zur Trockene eingeeengt.

Alle Rückstände werden mit 10 ml Puffer pH 1,2 gelöst. Anteile davon werden mit Puffer auf 5 ml ergänzt und nach Zugabe von 5 ml H₂O gegen ein Puffer-Wasser-Gemisch von 280-240 nm gemessen. Die Differenz $E_{257}-E_{280}$ dient auch hier als Meßgröße.

Daneben wurden mittels Gaschromatographie die Ausbeuten weiterer als flüchtig angesehener Basen untersucht. Neben der höheren Selektivität, verglichen mit der UV-Spektrophotometrie, ermöglichte der geringere Substanzbedarf den Einsatz weitaus niedrigerer Konzentrationen und damit eine Anpassung an die im Harn zu erwartenden Konzentrationsverhältnisse. Nachdem die in 3.2.2.3. beschriebene Aufarbeitung der HCl-Extrakte möglich war, konnten Eichwerte basischer Extrakte mit und ohne Säurezusatz analog wie unten beschrieben verglichen werden.

Methode: 400 μg Base (0,4 ml aus 100 mg Base/100 ml H_2O) werden zu 100 ml H_2O gegeben. Nach dem Ansäuern mit einigen Tropfen H_2SO_4 10%ig wird dreimal mit 100 ml Diäthyläther (peroxidfrei) ausgeschüttelt. Die organische Phase wird abgetrennt und verworfen. Nach dem Alkalisieren mit festem Na_2CO_3 (pH 11-12) wird erneut dreimal mit je 100 ml Äther eine Verteilung durchgeführt und die vereinigten Ätherextrakte in vier gleiche Teile geteilt. Zwei Viertel werden in je einer Abdampfschale bei Raumtemperatur abgedunstet, die Rückstände mit 1 ml 0,1 N HCl aufgenommen und in ein Zentrifugenspitzenglas mit Schliff übergeführt. Es wird zweimal mit 0,5 ml 0,1 N Salzsäure nachgespült. Nach Zusatz von 0,5 ml 2,5 N NaOH und 100 μl Chloroform wird durch dreimal 30sekundige Vibration am Mikromixer 154 B^{+}) verteilt. Nach Phasentrennung (evtl. kurze Zentrifugation) werden Aliquote der organischen Phase in den Gaschromatographen⁺⁺) injiziert. Die restlichen zwei Viertel des basischen Extraktes werden mit 0,5 ml methanolischer Salzsäure (0,12 N) in Abdampfschalen bei 40-60° im Sandbad eingengt. Die Aufarbeitung zur GC erfolgt wie oben.

Eichwerte: Zu 25, 50, 75 und 100 μg der betreffenden Substanz werden 2,0 ml 0,1 N HCl, 0,5 ml 2,5 N NaOH und 100 μl Chloroform in ein Schliffzentrifugenglas gegeben. Nach dreimal 30sekundiger Vibration werden nach der Phasentrennung Aliquote in den Gaschromatographen eingespritzt.

Die Mittelwerte der Peakhöhen wurden graphisch ausgewertet. In Tab. 2 sind die Mittelwerte der gefundenen Wiedergewinnungsraten aufgeführt.

+) Firma Beckman, München

++) Modell 1740, Varian, Darmstadt

Tab. 2: Gaschromatographisch bestimmte Wiederfindungsraten

	Mittelwerte		Temperatur der Säule
	ohne HCl	mit HCl	
Äthylephedrin	25	88	135°
Dimethylamphetamin	25	80	85°
Fencamfamin	25	98	140°
Phentermin	30	98	80°
Prolintan	25	90	125°
Propylhexedrin	20	88	80°
Pseudoephedrin	40	90	140°

Gaschromatograph: Modell 1740, Varian, Darmstadt; Säule: 2 % Carbowax 20 M/5 % KOH auf Chromosorb G AWD MCS (17); Länge: 3 Fuß, Glas; Temperatur: Einspritzblock 200°C, FID 225°C; Gasfluß/Min.: N₂ 25 ml, H₂ 25 ml, Luft 250 ml.

Die als Vergleich mitgeführte Bestimmung der freien Basen zeigte eine starke Abhängigkeit der Ausbeute von der Zeit der Exposition des Rückstandes in der Abdampfschale. Wird bis auf eine geringe Flüssigkeitsmenge eingeengt - es ist dabei ständige Aufsicht nötig - so können durchaus bessere Ergebnisse erzielt werden (10, 17, 26, 34). Bei den eigenen Versuchsreihen konnte dies bestätigt werden; so konnten unter obigen Bedingungen bis zu 60 % Äthylephedrin wiedergefunden werden.

In einem Versuch mit der 20fachen Menge (8 mg) Methamphetaminhydrochlorid verhielten sich, nachdem die Schalen mit den Extrakten (mit und ohne HCl-Zusatz über Nacht bei Zimmertemperatur offen standen) bei analoger Aufarbeitung die erzielten Peakhöhen mit den Retentionszeiten des Methamphetamins wie 60:1 zugunsten der Aufarbeitung mit Säurezusatz.

3.1.2. Prüfung der Stabilität isolierter Verbindungen

Bei der gaschromatographischen Ausbeutebestimmung fielen beim Vergleich der aus den Proben nach Isolierung gewonnenen Kurven mit denen des Ausgangsmaterials keine zusätzlichen Peaks als Zeichen für flüchtige Zersetzungsprodukte bei der Aufarbeitung auf. Es machte sich auch der Vorteil der Lagerfähigkeit der HCl-Extrakte positiv bemerkbar. Sie können als Vergleich für spätere Untersuchungen dienen und erlauben bei unbekannten Verbindungen auch nach längerer Zeit den Einsatz zusätzlicher Verfahren zur Identifizierung von Substanzen, über die dem Labor bisher keine Analysendaten vorlagen. An Spartein konnte schon nach

kurzer Lagerung der Base an der Luft der rasch abnehmende Gehalt an gaschromatographisch erfaßbarem Wirkstoff beobachtet werden, wobei Verharzung und dunkelbraune Verfärbung auftraten.

An einigen Beispielen wurde geprüft, ob bei der durch die hohen Wiedergewinnungsraten bestätigten Aufarbeitungsvariante evtl. gaschromatographisch nicht erfaßbare Zersetzungsprodukte entstehen, die geeignet sind, bei der IR-Spektrophotometrie Veränderungen hervorzurufen.

Die Abbildungen 2-10 zeigen jeweils den Vergleich des IR-Spektrums der eingesetzten Reinsubstanzen (a) und den nach 3.1. als Hydrochloride isolierten Basen (b), aufgenommen in KBr-Preßlingen mit einem Gerät Perkin Elmer 221.

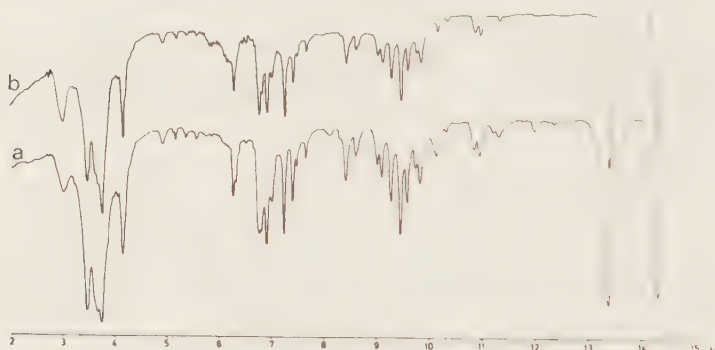


Abb. 2: Methamphetamine Hydrochlorid

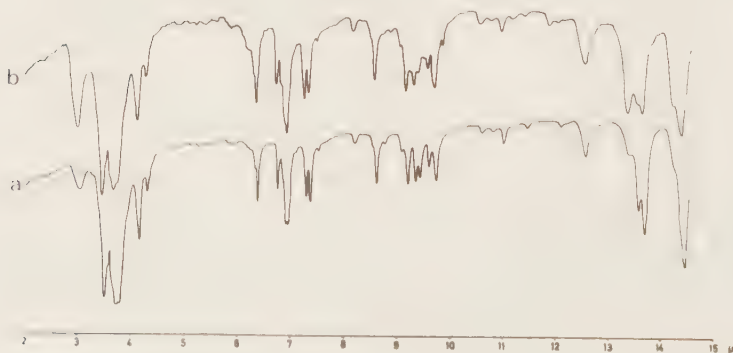


Abb. 3: Äthylamphetamine Hydrochlorid

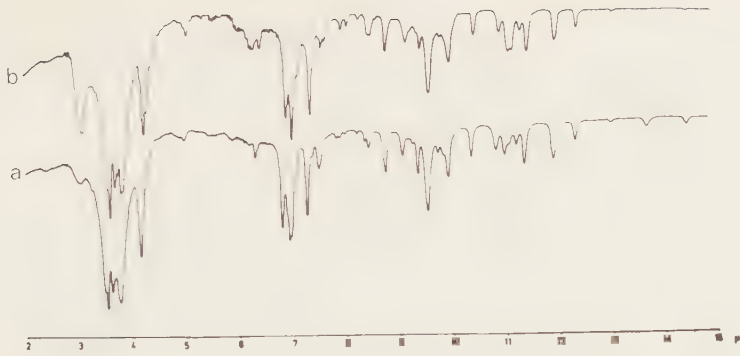


Abb. 4: Propylhexedrin Hydrochlorid

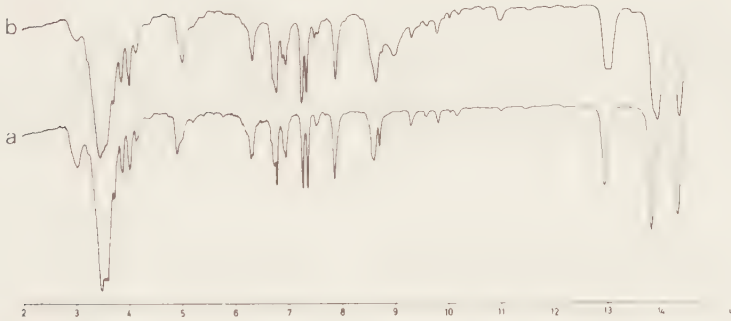


Abb. 5: Phentermin Hydrochlorid

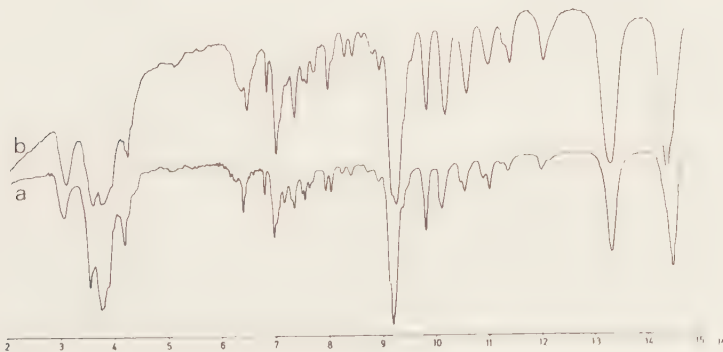


Abb. 6: Phenmetrazin Hydrochlorid

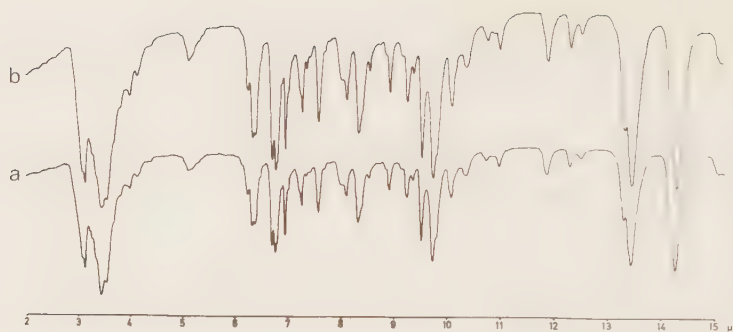


Abb. 7: Norephedrin Hydrochlorid

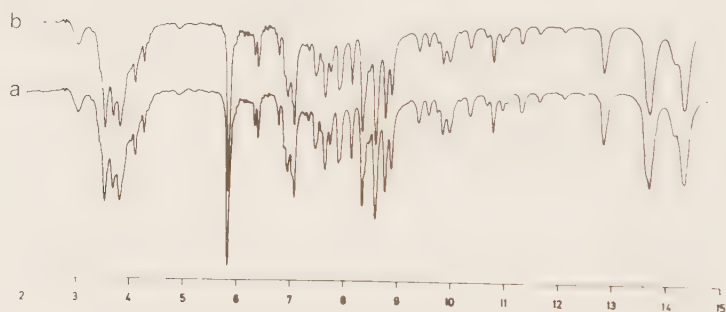


Abb. 8: Methylphenidat Hydrochlorid

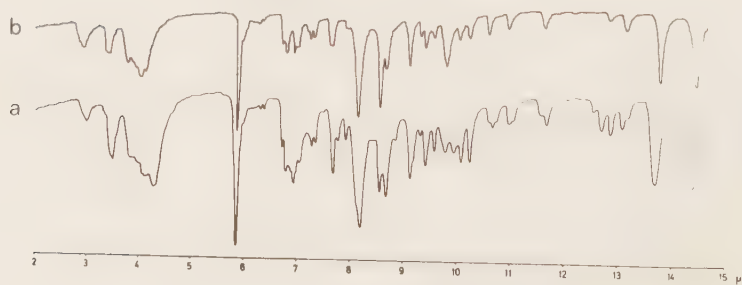


Abb. 9: Pethidin Hydrochlorid

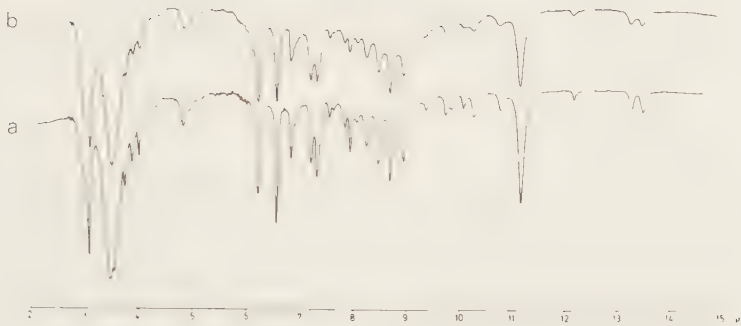


Abb. 10: Heptaminol Hydrochlorid

Bei den geprüften Substanzen konnten keine Unterschiede der Spektren als Hinweis für eine chemische Veränderung während der Isolierung gefunden werden, so daß die Erhöhung der Extraktionsraten durch die gewählte Aufarbeitung einen echten Vorteil darstellt.

3.2. Versuche zu Nachweis und Identifizierungsmethoden

3.2.1. Dünnschichtchromatographie

3.2.1.1. Arbeitsbedingungen

Die Durchführung der DC erfolgte nach der Standardmethode nach STAHL (124, 125) und nach RANDERATH (116) aufsteigend in Trögen (20,5 x 8 x 24 cm) mit unebenen und planen Bodenflächen. Auf Glasplatten 20 x 20 cm wurde das Sorbens mit dem Handstreichgerät der Firma Desaga (mit fester Schlitzhöhe) in einer Dicke von ca. 0,25 mm aufgebracht. Das Plattenmaterial wurde luftgetrocknet und aktiviert (30 Min. bei 110°C) verwendet. Mit einem Holzrechen nach nebenstehender Abbildung werden die Platten vor dem Auftragen der Analysensubstanzen in ca. 1 cm breite Bahnen unterteilt. Bei exaktem Einpassen der Metallstifte und Verwendung von Platten sortierter Dicke, waren auch nach zweijähriger Benutzung keine Kratzspuren festzustellen. Bei Plattenmaterial verschiedener Dicke müssen die Metallstifte durch dünne Federn angedrückt werden. Das Linieren erleichtert nicht nur das Auftragen der Substanzstartflecke, sondern auch die Zuordnung bei der Auswertung. Auf beide Randbahnen und in die Mitte wird jeweils der Bezugsstandard bzw. ein Leitgemisch gesetzt. Es wurde Dimethylamphetamin bzw. die Mischung Dimethylamphetamin/Coffein/Pethidin gewählt. Es schien nützlicher, Substanzen der zu trennenden Gruppe einzusetzen, als die häufig verwendeten Farbgemische, deren Wanderungsverhalten konträr sein kann. Bei der ohnehin durchzuführenden Detektion ermöglicht der Vergleich bzw. das Gemisch eine Prüfung der angewendeten Reagenzien. Durch die drei bis vier Standardbahnen auf jeder Platte sollen Unregelmäßigkeiten bei der Entwicklung leichter erkannt werden. Bei Verwendung aktivierter Schichten werden die Platten spätestens 30 Minuten nach der Entnahme aus dem Trockenschrank in

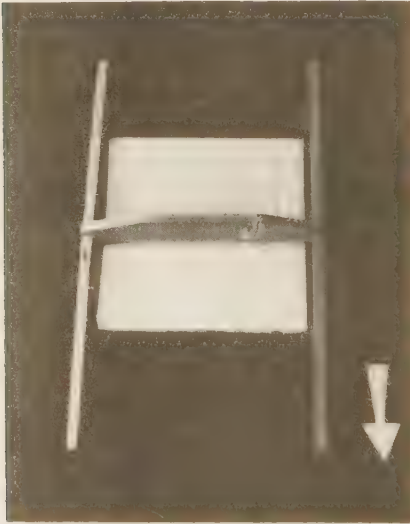


Abb. 11: Rechen zum Linieren der DC-Platten

Plattenmaterial wurde luftgetrocknet und aktiviert (30 Min. bei 110°C) verwendet. Mit einem Holzrechen nach nebenstehender Abbildung werden die Platten vor dem Auftragen der Analysensubstanzen in ca. 1 cm breite Bahnen unterteilt. Bei exaktem Einpassen der Metallstifte und Verwendung von Platten sortierter Dicke, waren auch nach zweijähriger Benutzung keine Kratzspuren festzustellen. Bei Plattenmaterial verschiedener Dicke müssen die Metallstifte durch dünne Federn angedrückt werden. Das Linieren erleichtert nicht nur das Auftragen der Substanzstartflecke, sondern auch die Zuordnung bei der Auswertung. Auf beide Randbahnen und in die Mitte wird jeweils der Bezugsstandard bzw. ein Leitgemisch gesetzt. Es wurde Dimethylamphetamin bzw. die Mischung Di-

dimethylamphetamin/Coffein/Pethidin gewählt. Es schien nützlicher, Substanzen der zu trennenden Gruppe einzusetzen, als die häufig verwendeten Farbgemische, deren Wanderungsverhalten konträr sein kann. Bei der ohnehin durchzuführenden Detektion ermöglicht der Vergleich bzw. das Gemisch eine Prüfung der angewendeten Reagenzien. Durch die drei bis vier Standardbahnen auf jeder Platte sollen Unregelmäßigkeiten bei der Entwicklung leichter erkannt werden. Bei Verwendung aktivierter Schichten werden die Platten spätestens 30 Minuten nach der Entnahme aus dem Trockenschrank in

den 20 Minuten vorher gemischten Fließmitteln mit einer Laufstrecke von 10 cm entwickelt. Es werden jeweils zwei Platten in einer Kammer bei Normalsättigung (NS) mit den Schichten zueinander möglichst steil eingestellt, um den Raum hinter den Platten klein zu halten. Das Fließmittel wurde, wenn nicht anders vermerkt, jeweils nur einmal verwendet.

3.2.1.2. Fließmittel mit Kieselgelschichten

Es wurde angestrebt, möglichst allgemein einsetzbare Fließmittelsysteme zu benützen, die für die Prüfung aller anfallender basischen Stoffe bei der toxikologischen Analyse Verwendung finden könnten. Zunächst wurden in der Literatur bereits beschriebene Laufmittelmischungen getestet. Fließmittelsysteme, die speziell zur Auftrennung kleiner Gruppen von Verbindungen entwickelt wurden, schienen für ein allgemeines Screeningverfahren weniger geeignet. Auch wenn, wie das Beispiel der Barbiturate zeigt, Rf-Werte aus verschiedenen Labors nicht unbedingt vergleichbar und übertragbar sind, können umfangreiche Datensammlungen aus anderen Labors Anhaltspunkte geben.

Neben den bereits für Sympathicomimetika eingesetzten Laufmitteln boten sich aus der Literatur Mischungen an, die sich bei der Trennung schwacher Basen, wie z.B. der Phenothiazine und der Suchtmittel, als nützlich erwiesen haben. Zunächst wurden die in Tabelle 3 aufgeführten Systeme geprüft:

Tab. 3: Geprüfte Fließmittel für Kieselgelschichten

Nr.	Mischung (Vol. / Vol.)	Autor
1	Chloroform: Methanol 50:50	NOIRFALISE (103, 104)
2	Chloroform: Diäthylamin 90:10	WALDI u. Mit. (137)
3	Chloroform: Aceton: Diäthylamin 50:40:10	dto.
4	n-Butanol: Eisessig: H ₂ O 50:40:10	DEBACKERE u. MASSART-LEEN (45)
5	Methanol: Aceton 50:50	MOERMAN (92)
6	Methanol: Aceton: Ammoniak (25 %) 47,5 : 47,5 : 5	dto.
7	Methanol: Aceton: Triäthanolamin 50:50:1,5	BÄUMLER u. RIPPSTEIN (11)
8	Isopropanol: Ammoniak (5 %) 100:10	RISTIC u. THOMAS (118)
9	Dimethylformamid: Äthylacetat: n-Octanol 10:90 + 30 Tropfen	EBERHARDT u. DEBACKERE (53)
10	Methanol: Benzol 20:80	NEUBAUER u. MOTHES (101)
11	Aceton: Ammoniak (25 %) 99:1	NOIRFALISE (103)
12	Methanol: Ammoniak (25 %) 99:1	dto.
13	Methanol 100	MACHATA (86)
14	n-Butanol: Eisessig: Wasser 88:5:7	FERRARI u. TOTH (60)
15	n-Butanol: Eisessig: Wasser 65:15:20	dto.
16	n-Butanol: Eisessig: Wasser 80:20:20	NÜRNBERG (105)
17	Methanol: Methylal 50:50	AWE u. SCHULZE (5)

Tab. 3: (Fortsetzung)

Nr.	Mischung (Vol. /Vol.)	Autor
18	Benzol:Dioxan:Ammoniak (25 %) 60:35:5	COCHIN u. DALY (41)
19	Methanol:Methylal:Chloroform 20:40:60	AWE u. SCHULZE (5)
20	Methylal:Aceton:Ammoniak (25 %) 50:50:1	dto.
21	Cyclohexan:Chloroform:Diäthylamin 50:40:10	WALDI u. Mit. (137)
22	Benzol:Dioxan:Aceton:Ammoniak (25 %) 50:20:28:2	WALDI (136)
23	Benzol:Aceton:Ammoniak (25 %) 100:20:10	PAULUS u. Mit. (109)
24	Benzol:Äthanol:Ammoniak (25 %) 100:20:10	dto.
25	Pyridin:Petroläther:Ammoniak (25 %) 20:90:2	EBERHARDT u. Mit. (55)
26	n-Butanol:Methanol 40:60	COCHIN u. DALY (41)
27	Aceton 100	GOLDENBERG u. FISHMAN (65)
28	Chloroform:Aceton 90:10	MACHATA (87) EL GENDI u. Mit. (56)
29	Chloroform:Äthanol 90:10	dto.
30	Chloroform:Äthanol 80:20	dto.
31	Cyclohexan:Diäthylamin 90:10	WALDI u. Mit. (137)
32	Methanol:Chloroform:Dimethylformamid 80:15:10	VIDIC u. NOACK (134a)
33	Chloroform:Isopropanol:Ammoniak (25 %) 70:35:0,7	CHUNDELA (35)

Tab. 3: (Fortsetzung)

Nr.	Mischung (Vol. /Vol.)	Autor
34	Isopropanol:Ammoniak (25 %) 99:1	eigene Mischung
35	Chloroform:Äthanol:Ammoniak (25 %) 90:10:0,5	WIENERT (145)
36	Chloroform:Methanol:Ammoniak (25 %) 10:90:2,5	dto.
37	Chloroform:Methanol:Ammoniak (25 %) 40:60:1	dto.
38	Benzol:Äthanol:Ammoniak (25 %) 30:70:1	dto.
39	Isopropanol:Ammoniak (25 %) 90:10	PALITZSCH u. Mit. (107)

Bei Verwendung von Kieselgel mit Gipszusatz⁺) zeigten Trennversuche mit den ausgewählten Verbindungen (Tab. 6), daß neutrale und saure Fließmittel für die Trennung - wenn auch Salze eingesetzt werden sollen - nicht geeignet waren. Es traten häufig langgezogene Flecken bis zur Streifenbildung auf. PALITZSCH u. Mit. (107) erhoben den gleichen Befund. Bessere Ergebnisse wurden mit der Reihe der basischen Mischungen erzielt. Unabhängig, ob die freie Base oder Salze chromatographiert werden, ergeben sich übereinstimmende Rf-Werte. Erst die Steigerung der aufgetragenen Mengen bis zur Ausbildung länglicher Flecke bringt die in Tabelle 4 aufgeführten geringen Unterschiede der hRf-Werte.

⁺) DGF Riedel de Haen, Seelze-Hannover

Tab. 4: Vergleich der hRf-Werte von freien Basen und Salzen bei der Dünnschichtchromatographie

Trägermaterial: Kieselgel mit Gipszusatz, luftgetrocknet ⁺⁾						
Fließmittel (NS):	Benzol	100	Benzol	60	CHCl ₃	90
	Aceton	20	Dioxan	35	Äthanol	10
	NH ₃ 25 %	10	NH ₃ 25 %	5	NH ₃ 25 %	0,5
	Salz	Base	Salz	Base	Salz	Base
Äthylamphetamin	69	72	78	78	65	71
Amphetamin	55	60	62	63	59	61
Dimethylamphetamin	75	75	85	85	68	70
Methamphetamin	65	64	62	63	48	52
Norephedrin	59	61	22	23	21	27
Äthylephedrin	63	65	90	88	65	68
Propylhexedrin	40	37	57	61	41	45
Prolintan	92	92	97	97	95	94
Phenmetrazin	38	35	68	67	76	76
Fencamfamin	89	90	96	98	94	92
Methylphenidat	71	70	90	90	95	96

+) Vom Einsatz luftgetrockneter Platten wurde wieder abgegangen, da die Trenneigenschaften hierbei größeren Schwankungen unterlagen. Bei fluktuierendem Plattenbedarf ist der nötige große Vorrat von Nachteil. Lagern die Platten längere Zeit, verändern sich die Schichten unter teilweiser Gelbfärbung. Im Vergleich dazu erweist sich die Verwendung des Plattenmaterials nach Aktivierung als flexibler.

Organische Basenreste aus dem Fließmittel stören bei einer Reihe von Nachweisreaktionen. Das Entfernen dauert meist auch bei höherer Temperatur länger und stellt bei Unvollständigkeit einen Unsicherheitsfaktor bei der Detektion dar.

Es wurden ausschließlich ammoniakhaltige Fließmittelsysteme verwendet, die gute Auftrennungen für die in Tab. 6 aufgeführten Verbindungen ergaben, eine Detektion bereits kurz nach beendeter Entwicklung erlaubten und die Detektionsmöglichkeiten praktisch nicht einschränkten. Die Mischungen 8, 11, 12, 18, 22, 23, 24, 33, 34, 35, 36, 37 und 38 (Tab. 3) wurden systematisch getestet.

Beim Fließmittel Nr. 10 entstand nach Zusatz von 0,5 ml NH_3 25%ig eine klare Lösung. Bei der Detektion zeigte sich die Ausbildung einer starken β -Front mit der zahlreiche der geprüften Stoffe laufen. Während das System Nr. 1 nach Ammoniakzusatz keine befriedigende Auftrennung brachte, erwies sich das Fließmittel Nr. 5 nach Zugabe von 1 ml Ammoniak als gut brauchbar. Die Fließmittel 6, 20 und 39 häuften die Substanzen im oberen Teil der Platte an.

Unter den ausgewählten Systemen finden sich mehrere trübe Mischungen. In den 20 Minuten Ruhezeit vor der Entwicklung kommt es weitgehend zur Phasentrennung. Störungen, verursacht durch aufsteigende Wasserphase, konnten durch Abstreifen des Sorbens am unteren Plattenrand ausgeschaltet werden. Bei Einsatz von Kammern mit unebenen Böden muß die unterschiedliche Eintauchtiefe beachtet werden. Die Trennschicht reicht so nur in das organische Gemisch. Dieses Verfahren wurde einer Abtrennung der verwendeten Phase und anschließender Klärung durch Filtrieren - wegen der Gefahr der dabei auftretenden unkontrollierbaren Veränderungen der Mischung - vorgezogen.

Bei Fließmitteln mit einem Anteil von mehr als 10 % Aceton und konzentriertem Ammoniak, kann sich auch nach längerem Erhitzen eine Störung der Detektion bei einer Reihe von Sprühlösungen, wie z. B. Jod, Ninhydrin, Echtblau, Echtschwarz, Bromkresolgrün ergeben, so daß hier die Einsatzfähigkeit des gewählten Detektionsmittels auf der Platte geprüft werden muß.

Vermutlich kommt es dabei zur Bildung von Kondensationsprodukten, ähnlich wie bei der Sättigung von Aceton mit Ammoniak Di- und Triacetonamin entstehen, die in den einzelnen Systemen verschieden hoch steigen (5a z. B. nur unteres Drittel). PALITZSCH u. Mit. (107) konnten diese Störung umgehen, wenn sie nur 10-12%igen Ammoniak den acetonhaltigen Fließmitteln zusetzten.

Bei der systematischen Prüfung der Reproduzierbarkeit zur Ermittlung der Rf-Werte enttäuschten einige Gemische, die sich durch ihre scharf begrenzten Flecken und die gute Trennung ausgezeichnet hatten (24, 35 und 18). Die Schwankungen der Rf-Werte (bei regelmäßig ausgebildeter Fließmittelfront), schien ihren Einsatz zu verbieten; z. B. schwankten die hRf-Werte des Dimethylamphetamin-Standards bis zu 20. Da die Werte auch innerhalb der 3 jeweils mitgeführten Standardpunkte einer Platte schwankten,

wurden Platten entwickelt, auf deren sämtlichen Bahnen nur Dimethylamphetamin aufgetragen war. Die Verbindung der Fleckenschwerpunkte nach der Detektion mit Dragendorffs Reagenz - im Folgenden als Kennlinie bezeichnet - wurde als Kriterium der Gleichförmigkeit der Entwicklung gewertet.

Beim Einstellen von je 2 Platten in die Mischung 35 ergaben sich unregelmäßig verlaufende Kennlinien, die meist auf den beiden Platten spiegelbildlich waren. Die Fließmittelfront verlief dabei parallel zur Startlinie. Durch Parallelversuche mit den einzelnen Beschichtungschargen im Fließmittel 12 konnte ausgeschlossen werden, daß die auftretende Störung die Folge inhomogener Beschichtung war.

Bei Ersatz der Trennkammer durch einen Trog mit planem Boden (Firma Desaga, Heidelberg) konnte das Ergebnis nicht verbessert werden. Es zeigte sich, daß bei diesem Fließmittel nach dem Durchmischen relativ rasch partielle Phasentrennung unter Ausbildung von "Fettaugen" eintritt, deren Folge Inhomogenität in flüssiger Phase und Gasphase ist, die eine gleichförmige chromatographische Entwicklung verhindert. Durch Zusatz von 3 bzw. 5 ml Aceton und Variation der Ammoniakmenge konnte keine homogene Phase zur Vermeidung obiger Störungen erzielt werden.

Im nächsten Schritt wurde geprüft, ob nach Filterpapiereinlagen zur Adsorption der Wasserphase unter den Bedingungen der Normalsättigung einheitliche Trennungen resultieren. Auch bei konstanter Eintauchtiefe (Pressglastrog) im Fließmittel macht sich der Randeffect stark - wenn auch regelmäßig ausgebildet - bemerkbar.

Durch völliges Ausschlagen der Kammer mit Filterpapier (sog. Kammer-sättigung) konnte der Randeffect bei der gleichzeitigen Entwicklung zweier Platten nicht völlig zurückgedrängt werden. Bei Präparategläsern mit stark gewölbten Böden vermochte Kammersättigung (KS) die Störung durch verschiedene Eintauchtiefen nicht merklich zu beeinflussen. Die besten Ergebnisse wurden erzielt, wenn bei KS nur eine Platte eingestellt wurde. Die Kennlinien verliefen hierbei parallel zur Laufmittelfront.

Im Fließmittel 24 konnte bei stufenweiser Reduzierung der wässrigen Phase bis zu einem Ammoniakgehalt von 2 ml die Störungen bei NS nicht beseitigt werden. Auch unter den Bedingungen der KS wurde bei der Literaturmischung die Wassermenge nur unvollkommen vom Papier aufgenommen. Deshalb wurde hier die Ammoniakmenge auf 2 ml reduziert. Schon nach kurzem Schwenken der Emulsion^{+) in der Kammer klärt sich das Laufmittel. Die damit erzielten Rf-Werte waren nur wenig verändert.}

Bei den Fließmitteln 18, 24, 24a, 35, 35a wurde jeweils nur eine Platte eingestellt, das Laufmittelgemisch jedoch zweimal verwendet.

+) Wurde bei Kammersättigung gearbeitet, so erfolgte die Mischung der Fließmittelkomponenten nicht im Entwicklertrog sondern in einem Schliffkolben.

3.2.1.3. Fließmittel mit anderem Schichtmaterial

Aus der Gruppe der von RÖDER u. Mit. als Fließmittel für die DC eingeführten Azeotrope, zeigte die Mischung Methanol/Methylacetat (17,7:82,2 Gewichtsprozent), die die Autoren zur Trennung der Phenothiazine (RÖDER u. Mit. 119) einsetzten, gute Ergebnisse (Fließmittel 41). Statt mit Wasser, wird das Sorbens mit der gleichen Menge 0,1 M Na_2CO_3 -Lösung angerührt. Für die Großgruppe der Psychopharmaka fanden die genannten Autoren fünf andere Azeotrope (120) besonders geeignet (2.2.1.1.). Der Vorteil der wiederholten Verwendbarkeit konnte dabei voll bestätigt werden. Während die oben beschriebenen Gemische schon bei der zweiten Trennung zum Teil Änderungen der Rf-Werte zeigten, konnte dies bei dem angewendeten Azeotrop selbst beim sechsten bis achten Lauf bei NS nicht bemerkt werden.

Beim Einsatz des von BÄUMLER u. Mit. (10) angegebenen Gemisches Toluol/Chloroform 1:1 für Al_2O_3 -Plattenmaterial konnte zwar eine Umkehr in der Reihe der Steighöhen, die auch bei den Kieselgelplatten stets Rf-Amphetamin $\geq$ Rf-Methamphetamin war, beobachtet werden. Die Auftrennung der als Testgruppe gewählten Substanzen Amphetamin, Methamphetamin, Dimethamphetamin, Äthylamphetamin, Propylhexedrin und Phenmetrazin war jedoch bei Einsatz der selbstbeschichteten Platten[†] unbefriedigend. Auch Toluol/Chloroform 3:1 bzw. Benzol/Chloroform 1:1 brachte keine besseren Resultate.

Der naheliegende Gedanke, bei Einsatz des Fließmittels 41 durch Benutzung von gepufferten Kieselgel- und gepufferten Aluminiumoxidplatten in einem Laufmittel unter Ausnutzung der Vorzüge des Azeotrops, in der Zeit für eine Entwicklung die doppelte Information zu gewinnen, erwies sich als Fehlschlag. Die hRf-Werte der Testsubstanzen lagen auf der Aluminiumoxidschicht zwischen 70 und 100.

Die bessere Auftrennung der Testgruppe wurde mit den Mischungen Toluol/Chloroform 25:75, Methanol/Chloroform 50:50, Toluol/Methanol 50:50, Benzol/Chloroform 50:50, Benzol/Methanol 50:50, Benzol/Azeton 50:50 auf gepufferten Al_2O_3 -Platten vergebens versucht. Gute Trennungen mit Verteilung über die gesamte Laufstrecke zeigt jedoch Chloroform/Aceton 85:15 und Chloroform/Äther 90:10. Da die Ergebnisse der zweiten Mischung die eingesetzten Amphetamine sehr gut trennte, wurden für sie ebenfalls die hRf-Werte bestimmt (Tab. 6).

Trotz der guten Trennleistung - und im Falle des Azeotrops der langen Anwendbarkeit - wurden bei den durchgeführten Versuchen Kieselgelplatten bevorzugt, da bei dem angewendeten Sprühschema die gepufferten Platten das Erkennen der Farbreaktion erschwerten und den Nachweis dadurch

[†]) Material Al_2O_3 Riedel de Haen, Seelze-Hannover

unempfindlicher machten. Daneben wurde bei der Mischung Chloroform/Äther und gepufferter Platte beobachtet, daß eine Reihe von Substanzen bei steigender Auftragsmenge bei vergleichsweise geringen Mengen (z. T. ab 30 µg) zur Schwanzbildung neigten.

3.2.1.4. Erzielte Trennungen

In der Tabelle sind die gefundenen hRf-Werte der Substanzen in den ausgewählten Fließmitteln aufgeführt. Unabhängig von ihrem Anfallen in einzelnen Gruppen, bzw. ihrem Auftreten im Harn, wurden die aufgeführten Substanzen in den Fließmitteln entwickelt (Vergleich Trennschema 3.4.1.). Die aufgeführten Werte stellen das Mittel aus 5-8 Einzelbestimmungen dar. Wegen der Varianz der Werte wurde auf eine Vielfachentwicklung, z. B. durch Einsatz des "Multiplate-Rack"^{+) in geeigneten Kammern, verzichtet und jeweils auf einer Platte in einem Fließmittel nur jeweils ein Wert für die betreffende Substanz bestimmt (Raumtemperatur $25 \pm 2^\circ \text{C}$).}

Über den aus mehr als 30 Bestimmungen gewonnenen Mittelwert für den Standard (Dimethylamphetamin) wurde jeweils linear umgerechnet.

^{+) Firma Desaga, Heidelberg}

Tab. 5: Eingesetzte Fließmittel für die DC

Nr.	Mischung (Vol. / Vol.)	Autor
5a	Methanol:Aceton:Ammoniak (25 %) 50:50:1	var. nach MOERMAN (92)
8	Isopropanol:Ammoniak (5 %) 100:10	RISTIC u. THOMAS (118)
11	Aceton:Ammoniak (25 %) 99:1	NOIRFALISE (103)
12	Methanol:Ammoniak (25 %) 99:1	
18	Benzol:Dioxan:Ammoniak (25 %) 60:35:5	NÜRNBERG (105)
22	Benzol:Dioxan:Aceton:Ammoniak (25 %) 50:20:28:2	WALDI (136)
23	Benzol:Aceton:Ammoniak (25 %) 100:20:10	PAULUS u. Mit. (109)
24a	Benzol:Äthanol:Ammoniak (25 %) 100:20:2	var. nach PAULUS u. Mit. (109)
33	Chloroform:Isopropanol:Ammoniak (25 %) 70:35:0,7	CHUNDELA (35)
34	Isopropanol:Ammoniak (25 %) 99:1	eigene Mischung
35a	Chloroform:Äthanol:Aceton: Ammoniak (25 %) 90:10:5:1	var. nach WIENERT (145)
36	Chloroform:Methanol:Ammoniak (25 %) 10:90:2,5	WIENERT (145)
37	Chloroform:Methanol:Ammoniak (25 %) 40:60:1	
38	Benzol:Äthanol:Ammoniak (25 %) 30:70:1	
41	Methanol:Methylacetat 17,7:82,3 (Gew. / Gew.)	RÖDER u. Mit. (120)
47	Chloroform:Äther 90:10	eigene Mischung

Tab. 6: Gefundene hRf-Werte mit aktivierten Schichten

	Narcompen	— ⁷	88	97	37	70	93	84	84	— ⁷	85	85	97	97	92	98	95
Noscapin ⁺																	
Opipramol ⁺		71	57	32	69	26	34	16	44	54	18	41	89	89	76	37	42
Orphenadrin ⁺		76	79	80	66	69	82	73	80	91	54	68	87	90	82	63	97
Oxazepam ⁺		— ⁷	83	98	90	19	73	12	27	89	76	42	91	94	90	95	01
Oxycodon ⁺		78	70	89	66	56	36	46	68	98	49	82	82	86	82	76	62
Papaverin ⁺		— ⁷	85	94	86	58	82	36	75	— ⁷	77	82	98	— ⁷	94	96	96
Pemolin ⁺		93	73	86	92	04	17	02	20	75	77	21	95	93	91	90	00
Pentetrazol ⁺		82	86	— ⁷	93	52	89	71	66	96	77	85	91	94	93	93	85
Pentorex ⁺		67	70	54	54	46	54	47	65	73	53	48	73	69	69	45	27
Peticiazin ⁺		85	77	79	80	32	53	16	42	68	45	41	89	90	88	69	18
Perphenazin ⁺		68	60	43	81	31	43	18	48	54	20	45	89	92	80	43	39
Pethidin ⁺		67	76	55	63	59	70	62	73	83	45	65	82	85	88	46	95
Phenelzin ⁺		— ⁷	93	94	65	12	91	85	28	36	18	81	77	72	55	01	00
Phenmetrazin ⁺		72	61	39	67	36	42	28	50	62	31	48	77	81	65	45	93
Phentermin ⁺		81	64	38	48	37	41	34	55	59	47	40	68	61	64	43	23
Pipradol ⁺		77	77	95	64	85	88	93	92	77	82	78	82	83	89	81	86
Prenylamin ⁺		— ⁷	94	97	86	86	96	96	89	— ⁷	89	79	96	— ⁷	— ⁷	97	96
Proclantan ⁺		63	79	31	54	81	— ⁷	96	86	86	62	75	75	74	78	61	96
Propylhexecrin ⁺		24	29	18	24	22	25	24	41	32	15	19	40	30	22	10	18
Pseudoephedrin ⁺		85 ⁵	24	— ⁹	33	11	— ⁸	— ⁸	28	14	14	13	47	35	25	17	02
Scopolamin		88	78	62	77	30	48	106 ⁶ (100)	38	79	44	40	88	93	86	67	12
Sparten ⁺		06		10	04	46	26	34	44	04	05	09	11	10 ⁴	08	03	54 ⁵
Strychnin		34	28	13	26	25	26	17	51	44	09	38	47	55	35	11	75
Strychnin-N-oxid		15	12	00	30	00	00	00	13	04	03	09	48	46	20	03	02
Strychninsaur ⁺		24	05	00	43	00	06	00	00	00	03	00	55	22	04	00	00
Thebacon ⁺		55 ⁶ (25)	41 ⁴ (16)	45 ⁶ (27)	50 ⁶ (27)	33 ⁴	58 ⁵	23 ⁴	70 ⁶ (46)	73	12 ⁴	63 ⁶ (30)	74 ⁵	79	62	38 ⁶ (11)	89
Theobromin		82	57	66	81	16	34	05	31 ⁵	73	34	40	87	86	74	69	01
Theophyllin		89	59	30	91	02	10	02	14	76	39	33	97	92	79	71	03
Teanylcypromin ⁺		98	82	95	75	51	95	87	62	86	58	91	94	86	87	96	11
Trifluorperazin ⁺		64	56	48	61	58	62	53	70	71	22	66	84	88	72	41	96

3.2.1.5. Ausgewählte Sprühreagenzien

Da sich ein Großteil der seit langem bekannten Farbreaktionen, z.B. der Alkaloide, durch entsprechende Variation auf die Papier- und später auch auf die Dünnschichtchromatographie übertragen ließ, steht für Basen eine schier unerschöpfliche Vielfalt von Sprühreagenzien zum Teil mit Kombinationsmöglichkeiten zur Verfügung. Ihnen allen gemeinsam ist, daß sie nur Gruppenspezifität haben, deren Grenzen bei möglichen großen Unterschieden der anwesenden Substanzmengen noch unschärfer werden. Unterscheidungsversuche auf Grund von Farbnuancen führen nur allzuleicht zu Fehlinterpretationen.

Aus der Vielzahl der Detektionsmöglichkeiten hat sich die folgende Reihe bei den durchgeführten Versuchen bewährt.

1. UV-Test

Nach dem Abblasen der Lösungsmittelreste werden die Platten auf fluoreszierende (366 nm) und fluoreszenzlöschende Verbindungen (254 nm) geprüft.

2. Jod in organischer Lösung

Anschließend kann mit Jod in Tetrachlorkohlenstoff besprüht werden. Dies empfiehlt sich besonders, wenn nur bestimmte Zonen zur Weiterverarbeitung aufgesucht werden sollen, die bei 1. negativ sind. Die entstehenden braunen Flecken verbleiben beim Abblasen des Jodüberschusses meist sehr rasch.

Reagenz: 2 g Jod werden in 100 ml Tetrachlorkohlenstoff gelöst.

3. β -Naphthochinonsulfonsäure nach BÄUMLER u. Mit. (10)

Nach weitgehendem Abblasen des Jodüberschusses wird mit dem Reagenz besprüht und einige Minuten bei 120° getrocknet. Zur besseren Darstellung der Färbung kann mit 10%iger Essigsäure schwach nachgesprüht werden. Es ergeben sich braune bis rotviolette Flecken auf gelblichem Untergrund.

Reagenz: 0,1 g Natrium- β -naphthochinon-4-sulfonat werden in 100 ml Alkohol-Wassergemisch (1:1) jeweils frisch gelöst.

4. Dragendorff Reagenz nach MUNIER u. MACHEBOEUF (99)

Nach dem Trocknen wird die Schicht mit Dragendorff Reagenz gut durchfeuchtet. Es erscheinen rotbraune Flecken auf gelbem Grund.

Reagenzlösung: Gemisch aus
(Vorrat)

- a) 0,85 g basischem Wismutnitrat in 10 ml Eisessig und 40 ml Wasser gelöst.
- b) 20 g Kaliumjodid in 50 ml Wasser gelöst.

Sprühlösung: 1 ml Vorratslösung werden mit 2 ml Eisessig und 10 ml Wasser gemischt.

5. Schwefelsauere Silbernitratlösung

Auf die im Warmluftstrom getrocknete Platte wird in Abwandlung nach HAUCK (68) schwefelsauere Silbernitratlösung dünn aufgesprüht.

Reagenz: Eine Mischung aus 2,5%iger H_2SO_4 und 1%iger Silbernitratlösung (95+5 V/V).

Es wird eine Stabilisierung der verblassenden Färbung nach 4. bei höherer Empfindlichkeit beobachtet. Die Reaktion ermöglicht eine Unterscheidung der Purine, die nach 4. negativ reagieren.

6. Jod in organischer Lösung

Auf die noch feuchte Schicht wird erneut Jodlösung nach Ziff. 2 gesprüht und der Überschuß mit Kaltluft abgeblasen. Es entstehen dunkelbraune Substanzflecke auf hellerem Untergrund.

Die Reaktion ist für viele Substanzen empfindlicher, die Färbung verblaßt nicht so rasch wie nach Ziff. 2.

Die bei der Schulanalyse in der DC (abgeschlossenes System hinsichtlich der Zahl der Stoffe) gut anwendbare Methode des Ausschlusses durch geeignete Aneinanderreihung der Sprühreagenzien und Fließmittel im offenen System liefert zwar wertvolle Information, führt aber nicht mit derselben Sicherheit zum Erfolg. Wegen der meist begrenzenden Substanzmengen und der Möglichkeit der GC aus der Farbzone zur Bestätigung (nach 3.3.), wurde auf eine weitere Ausdehnung der Sprühfolge für das Screening verzichtet. Nur bei mehr als 15 ml Ausgangsmaterial und bei gezielter Fragestellung werden ergänzende Reagenzien nach 2.2.1.2. angewendet.

An einer Auswahl möglicher Dopingsubstanzen wurde die Empfindlichkeit der Detektionsfolge geprüft, um den einzusetzenden Konzentrationsbereich für eine Untersuchung nach dem Gesamtschema 3.4.1. zu ermitteln. Dazu wurden 2, 4, 10 und 20 μg Base als Salz in methanolischer Lösung (2 mg/ml) im System 12 bzw. 24a entwickelt und nach Ziffer 1-6 detiziert.

Tab. 7: Empfindlichkeit der Detektionsfolge⁺⁾

Detektionsschritt		UV	Jod	Naphtho- tho- chinon	Dra- gen- dorff	H ₂ SO ₄	Jod
		(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)
Substanz	Bestandteil von						
Äthylamphetamin	Adiparthrol	(10)	4	-	4	4	2
Amfepramon	Regenon	2	2	2	20	(10)	2
Amphetamin	Elastonon	(4)	2	2	(4)	2	2
Cyclopentamin	Efrodal	-	2	-	10	4	2
Dimethylamphet.	Metrotonin	10	2	-	2	2	2
Etafedrin	Ditenate	4	(2)	20	(4)	4	2
Fencamfamin	Reaktivan	20	(2)	-	4	2	2
Heptaminol	Heptamyl	-	(2)	4	-	-	4
Methamphetamin	Pervitin	(4)	2	(10)	(4)	2	2
Methylephedrin	Ilvico	4	(4)	(10)	10	(4)	2
Methylphenidat	Ritalin	10	2	-	4	2	2
Nikethamid	Coramin	2	10	-	(20)	(4)	2
Norephedrin		(4)	(4)	2	(20) ⁺⁺⁾	(4)	10
Phenmetrazin	Preludin	(4)	(2)	-	10	(2)	4
Phentermin	Mirapront	(20)	4	-	-	-	(2)
Pipradol	T-Vitazell	4	2	(10)	(4)	2	2
Prolintan	Katovit	(20)	2	4	4	4	2
Propylhexedrin	Eventin	-	2	-	4	2	2
Pseudoephedrin		-	10	-	(20)	(4)	(2)
Sparteïn		-	2	4	2	2	2

() schwache Reaktion

- keine positive Reaktion bei 20 µg

+) Die Entwicklung erfolgte in den Fließmitteln 12 und 24a

++) Durch den hellrosa Farbton unterscheidet sich der Substanzfleck schlecht vom Untergrund.

Die gefundene Empfindlichkeit sollte neben den bei der Extraktion erzielten Werten eine Anwendung im Bereich 0,5 ppm zulassen.

Es ist dabei zu bedenken, daß nur Lösungen der Reinsubstanzen eingesetzt wurden. Bei der durch keinerlei Ballaststoffe gestörten Entwicklung ergaben sich sehr eng begrenzte Flecken (z. T. nur 2-3 mm Durchmesser); auch trat keine Färbung des Untergrundes auf, wodurch die Reaktion leicht erkannt werden konnte.

3.2.2. Gaschromatographie (GC)

Für die gaschromatographische Untersuchung stand ein Finsäulengerät Typ 116 E⁺) zur Verfügung. Das Gerät war durch den Einbau eines Flammenionisationsdetektors ergänzt. Die Spherogramme wurden mit einem 2,5 mV Kompensographen (L 288 x 288)⁺⁺) aufgezeichnet. Über einen eingebauten Strömungsteiler kann durch Aufsatz verschiedener Rekordkanülen auf den nach außen geleiteten Kanal der zur Detektion verwendete Anteil gesteuert werden. Das Gerät ist nur isotherm einsetzbar.

3.2.2.1. Arbeitsbedingungen

Bei Vorversuchen mit bereits vorhandenen Säulen wie 15 % Polyäthylenglykol 1500 auf Celite 545 (60/100), Apiezon L 25 % auf Celite 545 (60/100) und Porapak Q wurden bei verschiedenen Temperaturen, auch bei Injektion von Mengen bis 50 µg freie Base, bei Analysenzeiten bis zu zwei Stunden keine verwertbaren Signale erzielt.

Es wurde deshalb auf die von BECKETT u. Mit. (17) als gut einsetzbar bestätigten Säulenmaterialien Se-30 und Apiezon L/KOH zurückgegriffen. Folgende Materialien wurden in Stahlsäulen von 2 Metern Länge und 4 mm Außendurchmesser eingesetzt:

1. Se-30 2,5 % auf Chromosorb W 80-100 mesh AW-DMCS
2. Apiezon L 10 % KOH 10 % auf Chromosorb G 80-100 mesh AW-DMCS.

Da das Auswechseln der Säulen im Gegensatz zu neueren Geräten zeitraubend ist und häufig Funktionsstörungen provoziert, schienen obige Materialien wegen ihres weiten Einsatzbereiches günstig. Jedoch war durch das Gerät die Temperaturgrenze bei 200°C und die Druckgrenze bei 2,5 atü festgelegt.

⁺) Bodenseewerk Perkin Elmer, Überlingen

⁺⁺) Firma Siemens, Karlsruhe

3.2.2.2. Erzielte Trennungen

Abweichend von BECKETT u. Mit. (17) wurde die Se-30 bei 115, 180 und 200°C betrieben. Durch die Variation der Arbeitstemperatur gelang es, einzelne Gruppen besser zu trennen.

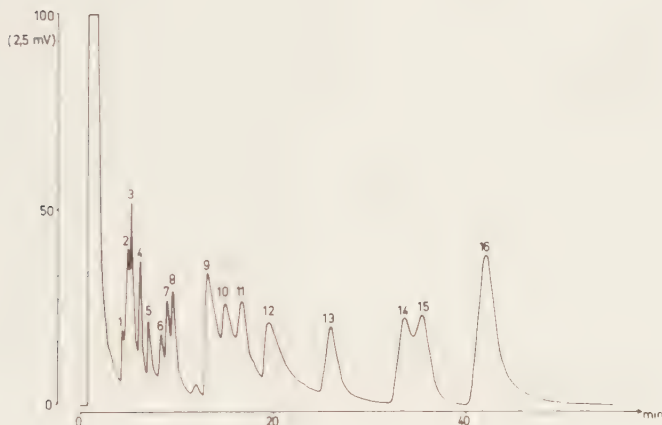


Abb. 12: Trennung eines Substanzgemisches bei 115°C

Gerät: 116 E, Säule: 2,5 % Se-30 (übrige Parameter Tab. 8)

1 Cyclopentamin, 2 Heptaminol, 3 Amphetamin, 4 Phentermin,
5 Methamphetamin, 6 Tranilcypromin, 7 Äthylamphetamin,
8 Dimethylamphetamin, 9 Phenelzin, 10 Norephedrin, 11 Chlor-
phentermin, 12 Pseudoephedrin, 13 Phenmetrazin, 14 Etafedrin,
15 Amfepramon, 16 Nikethamid

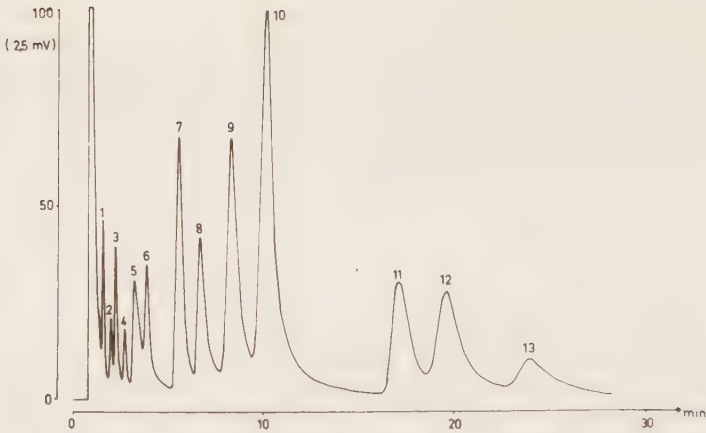


Abb. 13: Trennung eines Substanzgemisches bei 200°C

Gerät: 116 E, Säule 2,5 % Se-30 (übrige Parameter Tab. 8)

1 Dimethylamphetamin, 2 Chlorphentermin, 3 Methylephedrin,
4 Amfepramon, 5 Pentetrazol, 6 Prolintan, 7 Pethidin, 8 Spar-
tein, 9 Diphenylaminopropen, 10 Orphenadrin, 11 Normethadon,
12 Pipradol, 13 Etaqualon

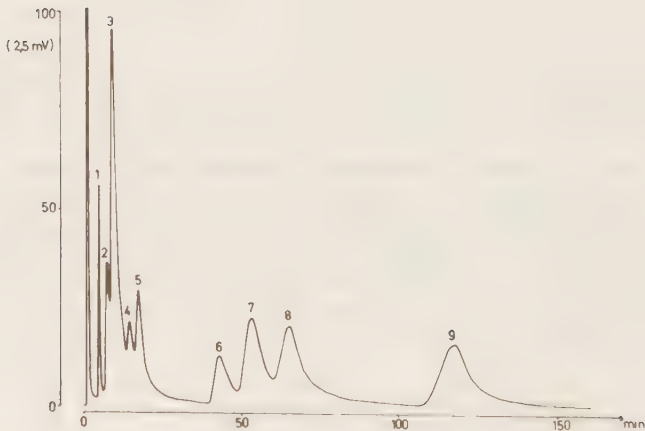


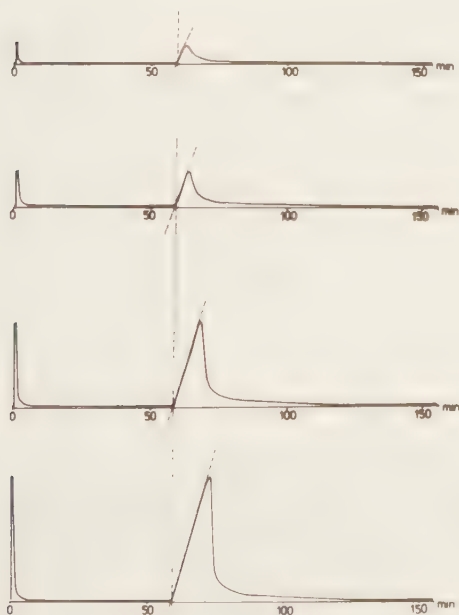
Abb. 14: Trennung eines Gemisches schwerflüchtiger Substanzen bei 200°C

Gerät: 116 E, Säule 2,5 % Se-30 (übrige Parameter Tab. 8)

1 Fencamfamin, 2 Coffein, 3 Etamivan, 4 2-Amino-5-chlorbenzo-
phenon, 5 2-Methylamino-5-chlorbenzophenon, 6 Codein, 7 Diaze-
pam, 8 Oxycodon, 9 Fenbutrazat

Bei den Untersuchungen stellte sich heraus, daß bei den gewählten Parametern nicht nur basische Substanzen sondern auch in anderen Fraktionen anfallende Verbindungen (Abb. 12, 13, 14) aufgetrennt werden konnten. Dies erwies sich als nützlich, da nur ein GC-Gerät zur Verfügung stand.

Wie bereits von BECKETT u. Mit. (17) berichtet, konnte an der Se-30 Säule festgestellt werden, daß die Retentionszeiten sich bei größeren Mengen an aufgegebener Substanz verringern. Bei kleinen Mengen flachen die Peaks rasch ab. Aus diesem Grunde läßt sich, wie unter 2.2.2. beschrieben, beim Arbeiten im Nanogrammbereich das Material nur schlecht einsetzen. Bei einigen Substanzen mit langen Retentionszeiten konnte das umgekehrte Phänomen beobachtet werden; der unregelmäßig ausgebildete Peak steigt langsam an, um nach dem Maximum steil abzufallen. Die Retentionszeit für das Maximum nimmt dabei mit steigenden Substanzmengen zu. Es gelang auch aus diesen Signalen verwertbare Informationen zu gewinnen. Es zeigte sich, daß der Schnittpunkt einer an den ansteigenden Peak angelegten Tangente mit der Nulllinie einen konstanten, von der Substanzmenge unabhängigen Wert ergibt.



Am Beispiel Chlorpromazin ergeben sich für die Maxima mit steigender Menge Retentionszeiten von 42,5, 42,9, 46,0 und 48,7 bezogen auf Dimethylamphetamin = 1,00. Dagegen wird nach obigem Verfahren für alle Mengen ein Wert von 40,3 erzielt.

Abb. 15: Mengenabhängigkeit der RT am Beispiel Chlorpromazin
Säule: 2,5 % Se-30 Temp. 200°C (übrige Parameter Tab. 8)

Die Säule mit 10 % Apiezon L/10 % KOH wurde bei einer Temperatur von 170°C gefahren, da hierbei für die Amphetamingruppe bei kurzen Retentionszeiten noch eine gute Auftrennung zu erzielen war (Abb. 17).

Bei der Bestimmung der Retentionszeiten für die einzelnen Substanzen wurde bei einer Injektionsmenge von 20-50 μg die Gesamtretentionszeit gemessen und auf Dimethylamphetamin = 1,00 bezogen.⁺)

+) Stehen GC-Systeme mit angeschlossenen Rechnern zur Verfügung, kann, statt auf Bezugsubstanzen aus der interessierenden Klasse oder Substanzen mit ähnlichem gaschromatographischem Verhalten umzurechnen, der auf die n-Alkanreihe bezogene Retentionsindex nach KOVATS (81) bequem bestimmt werden (52).

Tab. 8: Erzielte relative Retentionszeiten (RRT)¹

Säule:		Se-30 2,5 % ²			Apiezon L 10 %, KOH 10 % ³
Temp. Säule (°C)		115	180	200	170
Temp. Injektorblock (°C)		190	230	240	230
RT Standard (Min.)		9,6	3,2	1,55	4,9
Wirkstoff ⁴	Bestandteil der Spezialität ^R				
Äthylamphetamin	Adiparthrol	0,94	0,97	0,97	0,92
Äthylmorphin	Dionin	-	ps 57,0	T 27,9	
Amfepramon ⁺	Regenon	3,7	2,05	1,75	2,85 N 3,3
2-Amino-5-chlor- benzophenon			T 12,1	9,0	
2-Amino-5-nitro- benzophenon			T 44,3	ps 28,0	
Amphetamin ⁺	Elastonon	0,64	0,78	0,84	0,60
Azapetin	Ilidar		10,45	6,9	
Chlorphentermin ⁺	Avicol	1,75	1,35	1,25	1,75
Chlorpromazin ⁺	Megaphen	-	T 54,7	T 40,3	
N-(3-Chlorpropyl)- 1-methyl-2-phenyl- äthylamin	Pondinil	2,02 5,58	1,43 2,65	1,35 2,15	1,95 4,58
Codein		-	ps 47,5	27,1	-
Coffein		-	6,45	4,30	13,5
Cropropamid	Micoren	ps 13,1	4,25	3,13	5,62
Crotethamid	Micoren	ps 9,8	3,55	2,68	4,60
Cyclopentamin ⁺	Efrodal	0,44	0,68	0,77	0,79
Diazepam ⁺	Valium		T 58,3	T 31,4	
Dihydrocodein ⁺	Paracodin	-	T 45,7	T 13,3	
Dimethylamphetamin	Metrotonin	1,00	1,00	1,00	1,00
Diphenylaminopropen	Gilutensin	-	7,85	5,35	-
Etafedrin ⁺	Ditenate	3,55	1,97	1,65	2,80 N 0,32
Etamivan ⁺	Vandid		7,85	6,45	-

Tab. 8: (Fortsetzung)

Säule:		Se-30 2,5 % ²			Apiezon L 10 %, KOH 10 % ³
Temp. Säule (°C)		115	180	200	170
Etaqualon ⁺	Aolan	-	T 23,7	16,4	-
Etofyllin ⁺	Cordalin	-	-	ps 13,3	-
Fenbutrazat ⁺	Cafilon	-	-	73,3	-
Fencamfamin ⁺	Reaktivan	9,43	3,77	2,87	8,0
Heptaminol ⁺	Heptamyl	0,51	0,74	0,77	0,53
Hydrocodon ⁺	Dicodid	-	-	33,1	-
Methadon ⁺	Polamidon	-	ps 21,3	13,2	-
Methamphetamin ⁺	Pervitin	0,72	0,85	0,87	0,76
2-Methylamino-5-chlorbenzophenon			T 15,0	10,9	
4-Methyl-2-amino-pyridin	Ascensil	0,51	0,74	0,81	0,54
Methylephedrin	Ilvico	2,36	1,62	1,45	2,01 N 0,31
Methylphenidat ⁺	Ritalin	T 11,5 N 0,65	4,40 N 0,82	3,30	0,59 N 0,19
Nikethamid ⁺	Coramin	T 4,30	2,20	1,84	2,90
Norephedrin		1,50	1,30	1,16	1,40
Norpseudoephedrin		1,50	1,30	1,16	1,40
Orphenadrin ⁺	Mephenamin	-	T 9,30	6,42	ps 23,0
Oxycodon ⁺	Eukodal	-	-	43,4	-
Pentetrazol ⁺	Cardiazol	ps 4,6	2,41	2,10	3,45
Pentorex ⁺	Modatrop	1,0	1,0	1,0	1,0
Pethidin ⁺	Dolantin	T 13,9	4,95	3,60	8,35
Phenelzin ⁺	Nardil	1,37	1,17	1,13	0,25 N 0,58 N 1,20
Phenmetrazin ⁺	Preludin	2,70	1,72	1,53	2,45
Phentermin ⁺	Mirapront	0,64	0,83	0,87	0,69
Pipradol ⁺	T-Vitazell	-	T 19,9	13,3	
Prenylamin ⁺	Segontin	-	-	T 47,0	

Tab. 8: (Fortsetzung)

Säule:		Se-30 2,5 % ²			Apiezon L 10 %, KOH 10 % ³
Temp. Säule (°C)		115	180	200	170
Prolintan ⁺	Katovit	7,30	3,15	2,47	6,38
Propylhexedrin ⁺	Eventin	0,72	0,85	0,94	0,74
Pseudoephedrin ⁺		1,92	1,43	1,29	1,71
Sparteïn ⁺	ps	15,45	5,82	4,24	17,1
Thebacon ⁺	Acedicon	-	T 54,3 T 78,3	34,0 45,8	-
Tranilcypromin ⁺	Jatrosom	0,88	0,92	0,94	0,95
Trifluorperazin ⁺	Jatrosom	-	-	T 67,5	

1 Bezogen auf Dimethylamphetamin = 1,00.

2 Nach (17); Trägermaterial: Chromosorb W 80-100 mesh, AW-DMCS; Stahlsäule 2 m Länge, Außendurchmesser 4 mm; Trägergas: N₂ = 12 ml/Min.; FID-Brenngase: H₂ = 21, Luft = 320 ml/Min.
Durch den Widerstand der Säule war es notwendig, den Druck bis zum Maximalwert von 2,5 atü zu steigern.

3 Nach (17) Trägermaterial: Chromosorb G 80-100 mesh, AW-DMCS; Stahlsäule 2 m Länge, Außendurchmesser 4 mm; Trägergas: N₂ = 30 ml/Min.; FID-Brenngase: H₂ = 21, Luft = 320 ml/Min.

4 Kurzbezeichnung nach (75, 122); unabhängig vom Auftreten im Harn und der Zugehörigkeit zu analytischen Gruppen.

+ Von der Weltgesundheitsorganisation empfohlene bzw. vorgeschlagene Kurzbezeichnung (INN) nach (75, 122).

- Kein verwertbares Signal bis 150 Min. Analysendauer.

T Der Wert wurde durch Anlegen der Tangente an den ansteigenden Peakast ermittelt (s.o.).

N Nebenpeaks

ps Stark verbreiterte, abgeflachte Peaks sog. "peak spreading".

Bei einer Analysendauer von 150 Min. wurden für folgende Substanzen keine verwertbaren Detektorantworten erzielt: Cafedrin, Chinin, Chlordiazepoxid, Clopenthixol, Cocain, Dextromoramid, Dipyridamol, Fenetyllin, Floropipamid, Nitrazepam, Opipramol, Oxazepam, Papaverin, Periciazin, Perphenazin, Strychnin, Strychnin-N-oxid, Theobromin, Theophyllin.

Bei einem Vergleich der auf der Säule Se-30 bei 120°C erzielten Werte, mit den von BECKETT u. Mit. (17) für 115°C angegebenen Retentionszeiten, liegt der von diesen Autoren angegebene Wert für den Standard Dimethylamphetamin infolge der unterschiedlichen Parameter knapp unter der Hälfte.

Bezieht man jedoch die übrigen Retentionszeiten dieser Veröffentlichung ebenfalls auf Dimethylamphetamin, so zeigt sich, daß sie mit den in Tabelle 8 aufgeführten Werten streng linear verknüpft sind.

Für die Säule Apiezon L/KOH ist ein solcher Vergleich nicht durchführbar, da für die Bezugssubstanz kein Wert angeführt ist; die gefundenen Werte (Tab. 8) liegen hier jedoch beträchtlich niedriger.

Bei Retentionszeiten unter 10 Minuten gewährleistet bereits ein geringer Unterschied der RRT-Werte eine für die Praxis ausreichende Trennung. So ergibt sich beim Vorliegen etwa gleich großer Mengen für das Paar Äthylamphetamin/Dimethylamphetamin (Abb. 16), bei einer Differenz von ca. 0,1 der RRT-Werte, nach der von FELTKAMP (59) angewandten Methode für die Auflösung der beiden Peaks ein Wert von 0,85.

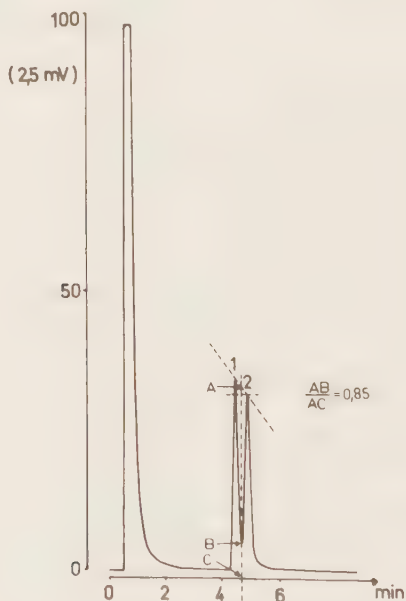


Abb. 16: Trennung bei geringem Unterschied der RRT-Werte

Gerät: 116 E, Perkin Elmer;

Säule: 2 m 10 % Apiezon L 10 % KOH,

Trärgas: N₂ 30 ml/Min. (übrige Parameter Tab. 8)

1 = Äthylamphetamin, 2 = Dimethylamphetamin

3.2.2.3. Extraktaufarbeitung zur Freisetzung der Basen

Bei den Versuchen zur Bestimmung des Retentionsverhaltens waren, wie von den meisten Autoren, die freien Basen eingesetzt worden. Besteht - wie am verwendeten Gerät - nicht die Möglichkeit, direkt auf die basische Säule zu injizieren⁺), muß, wenn nicht thermische Dissoziation bei sehr hohen Temperaturen mit der Gefahr der Zersetzung eingesetzt wird, eine Freisetzung aus den Salzen der Vergleichssubstanz und den salzsauerem Extrakten erfolgen.

Als eine Möglichkeit wurde die Behandlung eines Aliquotes des Extraktes mit Ammoniaklösung an Salzen von Reinsubstanzen geprüft. Ammoniak als flüchtige Base sollte eine möglichst geringe Verkrustung des Probeneinlaßteiles bewirken.

Methode: 20 µl einer wässrig-methanolischen Lösung von Amphetaminsulfat (= 200 µg) werden mit 5 µl wässriger Ammoniaklösung im Probengefäß der Mikrozentrifuge Spinco 152⁺⁺) gemischt. Vier, zwei und ein µl werden auf der Se-30 Säule 115°C (sonst Bedingungen wie in Tab. 8) chromatographiert.

Es werden bei allen drei Injektionen Signale mit der Retentionszeit des Amphetamins erzielt. Bei der Injektion von 1 µl erreicht der Schreiber ausschlag bei der Abschwächung 1/4 noch 15 % der 2,5 mV-Skala.

Bei der Wiederholung der Reihe mit Äthylamphetamin zeigte sich bei nachfolgender Injektion von Ammoniaklösung, daß Wirkstoff von einer Injektion zur nächsten verschleppt werden kann. Aus diesem Grunde wurde von der Anwendung dieser Methode abgesehen.

In einem weiteren Versuch wurde die Brauchbarkeit von Anionenaustauschern zur Freisetzung der Basen aus den Salzen untersucht.

Methode: 10 µl einer wässrig-methanolischen Amphetaminsulfatlösung (= 100 µg) werden mit 10 µl einer Methanol-Wassermischung 1:1 gemischt und ca. 5 mg Anionenaustauscher⁺⁺⁺) (DAB 7, stark basisch) zugefügt. Nach 5 Minuten unter mehrfachem Umschütteln wurden Anteile zur GC (wie vor) eingespritzt.

+) THOMSON & SMITH (131) schalten eine basische Vorsäule (10 % Apiezon L, 10 % KOH) ein und setzen dann wässrige, saure Salzlösungen (darunter auch Harn) ein. Eine Erfassungsgrenze wird nicht angegeben, jedoch treten Verschleppungen auf, die bis zu 4 % der Peakhöhe der vorher chromatographierten Lösung erreichen können. Durch mehrfache Ammoniakinjektionen zwischen den einzelnen Proben soll das System gereinigt werden.

++) Fa. Beckman, München

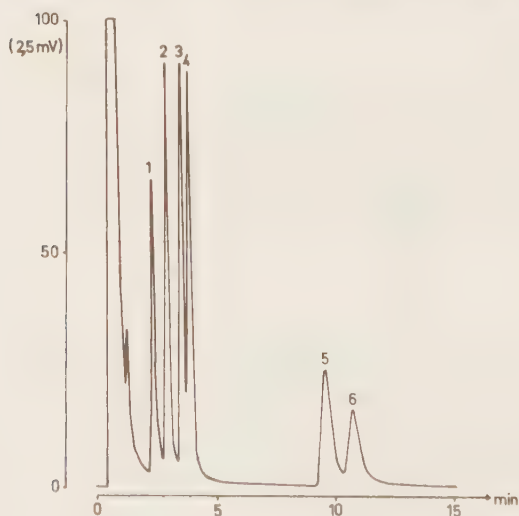
+++ Es hat sich hierbei gezeigt, daß das Harz im Leerversuch Substanzen abgab, die bei der GC im Bereich der interessierenden flüchtigen Basen liegen. Durch mehrmaliges gründliches Waschen mit destilliertem Wasser konnten diese Substanzen jedoch eliminiert werden.

Es konnten auch hierbei Signale mit der Retentionszeit des Amphetamins erhalten werden, jedoch zeigten die geringen Peakhöhen, daß nur Bruchteile der eingesetzten Substanz als freie Base vorliegen. Bei einem weiteren Versuch mit Phenmetrazin unter Beibehaltung der Mengenverhältnisse konnte keine zeitabhängige Steigerung der Freisetzung beobachtet werden. Die nach 10-20 Minuten erreichten geringen Peakhöhen steigerten sich auch nach einer Ansatzdauer von 2 Tagen nicht.

Als dritte Möglichkeit wurde die Extraktzubereitung mittels flüssig/flüssig-Verteilung untersucht. Dazu wurden die Salze mit Methanol gelöst; die für die GC vorgesehenen Aliquote konnten auf diese Weise ohne Verluste wieder eingeengt und weiterbehandelt werden. An Salzlösungen der Reinsubstanzen wurde zunächst die Umsetzung geprüft.

Methode: In einer Zentrifugenröhre der Spinco 152 werden 2,5-10 μ l (25-100 μ g) einer methanolischen Lösung der Salze der flüchtigen Basen mit einer Mikroliterspritze dosiert. Auf dem Sandbad wird bei 40° abgedunstet. Der Rückstand wird mit 20 μ l NaOH 10 % und 15 μ l Chloroform versetzt. Es wird dreimal 1 Minute am Mikromixer 154 b^{+) durchgemischt; anschließend 1 Minute abzentrifugiert. Anteile der organischen Phase wurden gaschromatographisch untersucht.}

Nachdem sich bei der Prüfung von einzelnen Substanzen auch im Bereich unter 1 μ g noch gut verwertbare Peaks ergaben, wurde nun ein Gemisch von Dopingmitteln nach dieser Methode behandelt (Abb. 17).



Gerät: Perkin Elmer
Modell 116 E

Säule: 10 % Apiezon L/
10 % KOH
(siehe Tab. 8)

Trägergas:
N₂ = 40 ml/Min.

Temp.: 170°C

Abschwächung 1/4

1 = Amphetamin
2 = Methamphetamin
3 = Äthylamphetamin
4 = Dimethylamphetamin
5 = Phenmetrazin
6 = Etafedrin
theoretischer Einsatz
je 1 μ g Salz

Abb. 17 Freisetzung der Basen aus den Salzen

^{+) Firma Beckman, München}

Es wurden dabei je 10 μ l wässrige Salzlösung (= 100 μ g), 50 μ l NaOH 10 % und 100 μ l CHCl_3 eingesetzt. Die Injektionsmenge von 1 μ l entsprach einem theoretischen Einsatz von 1 μ g Salz der betreffenden Basen.

Bei der Freisetzung der Basen nach dieser Art der Verteilung ist von Vorteil, daß wegen der geringen Menge an organischer Phase neben einer weiteren Reinigung der Extrakte eine Anreicherung der Basen erzielt wird. Störungen der Chromatographie durch Verschmutzung des Einspritzteils werden dadurch weitgehend vermieden.

3.2.2.4. Versuche zur Dampfraumanalyse

Es bestand die Möglichkeit, den für die Blutalkoholbestimmung eingesetzten automatischen Gaschromatographen F 40⁺⁾ für den Nachweis der flüchtigen Basen nach der Dampfraumanalyse heranzuziehen. Als Testsubstanz diente Amphetaminsulfat. Bei Vorlage von 1 ml einer wässrig alkalischen Probe in den 20 ml Gefäßen wurden unter einem Gehalt von 0,1 mg/ml (100 ppm) bei einer Ansaugzeit zur Probendosierung von 0,4 Sekunden keine gut verwertbaren Peaks erzielt. Es wurde dabei mit einer 2 m Säule 15 % Polyglykol 4000 und KOH auf Kieselgur 60/100 mesh bei 150°C gearbeitet. Die Temperatur des Wasserbades betrug 70°C.

Danach schien die Methode zwar für pharmazeutische Präparate gut anwendbar, jedoch nicht für Harnproben im Konzentrationsbereich von 1 ppm und darunter. Zudem wäre bei geringen Probenmengen durch diese nur als Paralleluntersuchung durchzuführende Methode das Material nicht optimal genutzt. Es wurde deshalb (neben den Schwierigkeiten, das stets im Routinebetrieb laufende Gerät jeweils umzubauen) auf weitere Versuche verzichtet.

BRANDENBERGER (25) berichtet über die Einsatzmöglichkeit der gleichen Apparatur für Harnproben, jedoch werden auch hierbei nur Mengen im 10 μ g-Bereich erfaßt, so daß diesem Verfahren nur begrenzte Bedeutung zukommt.

3.2.3. IR-Spektrophotometrie

Da die Basen nach der vorgeschlagenen Isolierung als Salze in fester Form anfallen, sind sie einfacher zu KBr-Preßlingen zu verarbeiten als die meist öligen Basen. Beim notwendigen Umlösen ist bei den Salzen anschließend Wärme- und Vakuumtrocknung ohne Verluste ausführbar. Da die meisten der in Frage kommenden Basen ohnehin als Hydrochloride in Handelspräparaten Verwendung finden, sind sie leicht zu Vergleichszwecken zugänglich. Dieser Vorteil kann jedoch nur gelegentlich bei der Analyse von Arzneimittel- und Getränke- resten genutzt werden. Bei biologischem Probenmaterial fallen genügend reine Extrakte in ausreichender Menge für die normale Präparation von Preßlingen nicht an.

+) Bodenseewerk Perkin Elmer, Überlingen

Bei Übergang zu Mikromethoden, wie sie die in den Harnproben enthaltenen Absolutmengen erforderlich machen, zeigten sich Schwierigkeiten, die die Aufarbeitung nach der DC-Passage mit sich bringt. Während KBr-Verreibungen mit einem Gehalt von ca. 5-10 μg Salz pro Mikropellet von 2 mm Durchmesser unter Einsatz der Mikroprobeneinheit (6X am Gerätetyp 221⁺) noch Spektren lieferten, versagte die Anwendung bei den angesäuerten Extrakten nach der Dünnschichtpassage. Der Einsatz der KBr-Kegeltechnik (Wick-Stick⁺⁺) erlaubt eine Konzentration und beschränkte Reinigung aus dem Eluat, jedoch wird der Zeitaufwand noch wesentlich vermehrt. Das allgemeine Problem der Erzielung genügend reiner Substanzen nach Passagen der Anreicherung und Vortrennung aus biologischem Material, wie sie z. B. auch VIDIC (133) und EL GENDI u. Mit. (56) hervorheben, war auch durch die vorgeschlagene Isolierung nicht gelöst, obwohl die Salze, wie erwähnt, leichter als die flüssigen, flüchtigen Basen zu handhaben sind. Für die Routineanalyse kam die IR-Spektrophotometrie deshalb nicht in Frage.

Der Anfall der Salze ermöglicht in manchen Fällen auch das Heranziehen von Thermomikromethoden nach KOFLER (80). Durch die Weiterentwicklung der Methode ist nach MARTINEK (89) eine Substanzreinigung und Schmelzpunktbestimmung zwar bis in den 50 μg Bereich möglich, jedoch wurde diese Methode nicht eingesetzt, da ihre Anwendung auf Ausnahmefälle beschränkt ist.

3.3. Versuche zur Kombination DC - GC

Nachdem die Freisetzung der Basen aus den Hydrochloriden für die GC, wie in 3.2.2.3. gezeigt, gut gelang, sollte zur Gewinnung weiterer Informationen neben Extraktionsverhalten, Rf-Wert und Anfärbbarkeit zur Identifizierung die durch die anschließende Gaschromatographie gewonnene Aussage treten. Um die Beweiskraft der durch Einsatz verschiedener Säulen gewonnenen Ergebnisse zu erhöhen, sollte die GC-Analyse aus einer Zone der Dünnschichtplatte, die bei der Detektion positiv reagierte, und nicht wie üblich aus den Extrakten, durchgeführt werden. Dies schien besonders nützlich, da häufig mehrere Substanzen gefunden werden und bei der gaschromatographischen Untersuchung des Gesamtextraktes eine Zuordnung der evtl. erzielten Peaks zu den gefundenen Rf-Werten der angefärbten Flecken Unsicherheiten mit sich bringt. Es muß dabei bedacht werden, daß auch trotz umfangreicher Datensammlungen mit dem Auftauchen unbekannter Verbindungen gerechnet werden muß, d. h. man arbeitet stets mit einem "offenem System" an Analysensubstanzen.

⁺) Firma Bodenseewerk Perkin Elmer, Überlingen

⁺⁺) Firma Harshaw, Cleveland, Ohio

3.3.1. Elution des Substanzfleckes ohne Detektion

Es wurde die zu untersuchende Probe auf zwei nebeneinanderliegende Startpunkte aufgetragen, wovon einer nach der Entwicklung zur Detektion herangezogen wurde, während aus der unbesprühten Bahn die Zonen zur Elution für die Gaschromatographie zur Verfügung standen. Die bei STAHL (124, 125) und RANDERATH (116) angegebenen Absaugvorrichtungen für das Sorbens zur Elution waren, wegen der zu erwartenden Konzentration der erzielten Lösungen und der damit erneut nötigen problematischen Einengung relativ großer Flüssigkeitsmengen, weniger geeignet.

Folgende Methode hat sich als brauchbar erwiesen:

Je 20-50 μg des Salzes werden auf zwei nebeneinanderliegende Startpunkte einer linierten DC-Platte appliziert und im Fließmittel 12 entwickelt. Bei der Detektion mit Dragendorff-Reagenz wird jeweils nur eine Bahn besprüht.

Das Sorbens der abgedeckten Bahn wird in Höhe der detizierten Substanz mit einem Spatel abgekratzt und in einem Probenröhrchen der Mikrozentrifuge Spinco 152 dreimal mit je 200 μl Methanol 5 Minuten mit dem Mikromixer geschüttelt. Nach dem Abzentrifugieren wird der Überstand jeweils mit einer Mikrospritze abgenommen, in einem zweiten Zentrifugenrohr gesammelt, 10-20 μl methanolische HCl 0,12 N zugefügt und auf dem Sandbad bei 50°C abgedunstet.

Der Rückstand wird mit 15-20 μl Chloroform aufgenommen. Nach Zugabe von 20 μl NaOH 10 % wird zweimal 1 Minute mit dem Mikromixer dispergiert, 90 Sekunden zentrifugiert und aliquote Teile der organischen Phase zur GC eingesetzt.

Das geschilderte, im Prinzip häufig angewendete Extraktionsverfahren zur Rückgewinnung dünn-schichtchromatographisch gereinigter Substanzen, wird auch für die Dopinganalyse beschrieben (34). Es erwies sich jedoch als umständlich und zeitraubend, insbesondere nahm das Einengen in den Zentrifugenröhrchen zu lange Zeit in Anspruch. Es wurde deshalb versucht, den Wirkstoff in einer einmaligen Mehrphasen-Verteilung aus dem Sorbens zu extrahieren.

Methode: Das wie oben in einem Zentrifugengefäß gesammelte Sorbens der betreffenden Zone wird nach Zugabe von 50 μl Na_2CO_3 -Lösung 20%ig und 30 μl Diäthyläther dreimal 3 Minuten dispergiert und abzentrifugiert.

Dabei machte sich die Flüchtigkeit des Äthers nachteilig bemerkbar. Um das Äthervolumen in Kontrolle zu haben, war es nötig, die Röhrchen zwischen den einzelnen Operationen in ein Eisbad zu stellen. Zudem ließen sich aus der durch die konische Form der Gefäße bedingten dünnen organischen Schicht schlecht Anteile abnehmen.

Bei Verwendung von Chloroform als organische Phase ergab sich nach dem Abzentrifugieren eine Bodenschicht von CHCl_3 , die mit Sorbenspartikeln vermischt war und somit keine Probenentnahme mit der Mikroliterspritze zuließ.

Bei Variation der organischen Phase durch Zusatz steigender Mengen Äther zu Chloroform ergab sich bei dem verwendeten Sorbens bei einem Volumenverhältnis 1:1 eine gute Abtrennung des Kieselgels als Bodenkörper. Die Phasen waren nach der Zentrifugation in der Reihenfolge Sorbens, organisches Lösungsmittel, wässrige Schicht getrennt. Selbst bei sorgsamer Manipulation wurde die Schichtung jedoch leicht zerstört und durch Ausbildung von Flüssigkeitsfilmen eine saubere Entnahme der organischen Phase sehr erschwert.

Bei Einsatz von 5- und 10%iger NaOH verschwand auch diese Schwierigkeit. Anteile der organischen Phase waren nun gut mit einer Mikrospritze zu entnehmen. Der verbleibende Rest war durch die darüberliegende Wasserphase am Verdunsten gehindert und konnte für weitere in Frage kommende Identifizierungsreaktionen eingesetzt werden. Bei Verwendung anderer Sorbentien, insbesondere von Fertigplatten, müssen unter Umständen die hier angegebenen Mengenverhältnisse für Chloroform:Äther u. s. w. geprüft und gegebenenfalls neu bestimmt werden.

3.3.2. Elution im Mikromaßstab nach vorausgegangener Detektion

Nachdem sich bei der GC-Prüfung der bei dieser Einmalverteilung erhaltenen Lösungen am 116 E recht gute Ergebnisse zeigten, lag die Überlegung nahe, aus besprühten Flecken genügend Substanz für die gaschromatographische Prüfung zu gewinnen. Es würde dadurch

- a) die Substanzmenge für den zu eluierenden Parallelpunkt in der DC für ein weiteres System mit anderen Sprühreagenzien zur Verfügung stehen, bzw.
- b) die Nachweismöglichkeit durch Auftragen der Gesamtextraktmenge auf einem Punkt erhöht und in jedem Falle
- c) Fehler durch Inhomogenitäten des Plattenmaterials, die zu verschiedenen Rf-Werten des zu eluierenden und des zu detizierenden Fleckens führen könnten, vermieden.

Bei größeren Substanzmengen sollte es möglich sein, die aus einem Flecken zurückgewonnene Substanz zur Gewinnung weiterer Informationen neben der GC in andere DC-Systeme einzuführen. Mehrere Autoren beschreiben, daß der mit Dragendorff-Reagenz erhaltene Farbkomplex mit Reduktionsmitteln im basischen Bereich wieder spaltbar ist (CURRY 42, DEBACKERE u. LARUELLE 44). Es wurde deshalb die Extraktionsbedingung derart abgewandelt, daß das zu eluierende Sorbens nacheinander mit 1,5 Teilen 10%iger Na_2SO_3 -Lösung, 1,5 Teilen 10%iger NaOH und 2 Teilen des Elutionsgemisches Äther/Chloroform 1:1 versetzt wurde. Beim Durchmischen verschwand die braune Farbe des Kieselgels. Bei den verwendeten Zentrifugenröhrchen war die Abnahme der Probenlösung erst ab 20-30 μl organischer Phase gut durchführbar.

Es wurde deshalb versucht, die Extraktion in der Dimension von Schmelzpunktröhrchen durchzuführen, um auch im Bereich der DC-Erfassungsgrenze in einer Einmalverteilung, ohne weiteres Einengen, möglichst konzentrierte Lösungen für die gaschromatographische Prüfung zu erhalten. Die geringe Probengröße für die Gaschromatographie läßt eine Reduzierung bis in den μl -Bereich zu.

Die Verwendung von Kapillaren beim Umkristallisieren und Filtrieren kleiner Substanzmengen wird von FUCHS (62) beschrieben. Die Methode wurde von LIEB u. SCHÖNINGER (85) übernommen. Sie wurde jedoch bisher nicht eingesetzt, um Stoffe von Sorbentien abzulösen, bzw. durch eine Mehrphasenverteilung davon zu extrahieren.

Schwierigkeiten ergaben sich bereits beim Überführen des besprühten und getrockneten Sorbens in die englumigen Röhrchen (Innendurchmesser ca. 1,5 mm). Als Pulvertrichter wurden schließlich Pasteurpipetten eingesetzt, die so weit gekürzt wurden, daß sie sich ca. 5 mm in das offene Ende der Röhrchen einschieben ließen. Für eine rasche verlustfreie Übertragung erwies es sich als notwendig, das auf einem Schiffchen aus glattem Papier gesammelte, gutgetrocknete Sorbens der Substanzzone mit einem Spatel gründlich zu verreiben, um die bei der Detektion entstandenen Agglomerationen zu zerstören. Dadurch wurde verhindert, daß die Einfüllkapillare verstopft wurde. Das Sorbens fließt bei geringer Erschütterung (Gegenklopfen mit einem Spatel) zügig durch die Kapillare in das Röhrchen ab.

Das für die Elution im Zentrifugenbecher benutzte Elutionsgemisch konnte ebenso beibehalten werden wie die Zusammensetzung der wässrigen Phase. Als nachteilig erschien, daß eine Phasendurchmischung durch Schütteln - auch bei Einsatz einer Hochfrequenz-Schwing-Mühle⁺ - nicht mehr möglich ist. Dies läßt sich auch nicht vermeiden, wenn man Röhrchen mit weiterem Lumen (ca. 3 mm) wählt. Jedoch wird dann bei wenig Lösungsmittel die Entnahme durch die geringe Schichthöhe wesentlich schwieriger. Eine Durchmischung der Phasen wurde schließlich durch mehrmaliges gegenständiges Zentrifugieren der Röhrchen erzielt. Es genügen bei der eingesetzten Mikrozentrifuge jeweils Zeiten von ca. 5 Sek. (Arbeitsvorschrift 3.5.3.). Bei Einsatz von 5 μl Extraktionsmischung lassen sich noch Proben für ca. 2-3 GC-Injektionen entnehmen. Es wurden jeweils 15 μl Na_2SO_3 (10 %) und 15 μl NaOH (10 %) eingesetzt, während die organische Phase je nach Stärke der Farbreaktion von 5-20 μl variiert werden kann.

Das Sorbens trennt sich beim Zentrifugieren gut von den flüssigen Phasen ab. Längere Zentrifugationszeiten bringen die Gefahr des Festbackens des Sorbens und damit eine weniger effektive Durchdringung der Phasen im Gestrom mit sich. Eine Auflockerung der Festsubstanz durch Anlegen an den Rotor des Mikromixers 154 B⁺⁺) ist dann unumgänglich (vergl. 3.5.3.).

+) Modell MM, Firma Retsch, Haan

++) Firma Beckman, München

Tab. 9: Mittelwerte der Extraktionsraten nach der Dünnschicht-chromatographie (Mikroverteilung):

Substanz	Einsatz μg	Säulentemp. $^{\circ}\text{C}$	Ausbeuten %
Äthylamphetamin	2	80	70
Methylamphetamin	3	80	55
Methylephedrin	5	130	45
Nicethamid	4,5	145	70
Prolintan	4,5	125	55
Sparteïn	5	140	55

Die Bestimmungen wurden an einem GC-Gerät vom Typ 1740⁺⁾ durchgeführt. Die Trennung erfolgte auf einer selbstgefüllten Stahlsäule mit 2 % Carbowax 20 M und 5 % KOH auf Chromosorb G AW-DMCS (17). Innendurchmesser der Säule 2 mm, Länge 3 Fuß. Es wurden folgende Parameter konstant gehalten: N_2 = 25 ml/Min., H_2 = 25 ml/Min., Luft 250 ml/Min., Einspritzblock 200°C, Detektor 225°C; die Ofentemperatur wurde variiert.

Als Bezugswert diente die analog nach 3.5.3. ohne Sorbens verteilte Einsatzmenge. Über die Peakhöhen wurde linear umgerechnet. An einem bei der Blutalkoholbestimmung eingesetzten automatischen Gaschromatographen F 40⁺⁺⁾ mit einer 2 m Apiezon L/KOH-Säule (3.2.2.1.) konnten die Versuchsergebnisse bestätigt werden. Bei manueller Injektion von Extraktanteilen (3.5.3.) aus der jeweils aufgetragenen Menge für die DC von 2 μg , wurden für die geprüften Substanzen Dimethylamphetamin, Methylephedrin, Phenmetrazin, Äthylamphetamin und Prolintan gute Detektorantworten erzielt. Demnach waren auch noch bei Bruchteilen der eingesetzten Mengen gut verwertbare Detektorsignale zu erwarten. Im Gegensatz dazu lagen die Nachweismöglichkeiten bei dem älteren Gerätetyp 116 E⁺⁺⁾ ungünstiger. Obwohl das Gasstromverhältnis Ausgang/Detektor ca. 1:2 betrug, erwiesen sich bei Injektion der Hälfte der organischen Extraktlösung am Beispiel Methylephedrin 8 μg bereits als untere Nachweisgrenze. Für die Amphetamine und Fencamfamin lagen die Verhältnisse günstiger. Es konnten auch hier bei 2 μg noch - wenn auch weitaus schwächere - Signale erhalten werden.

Das gute Ergebnis bei der durchgeführten Mehrphasenverteilung mit den geringen Mengen organischer Phase zeigte, daß trotz des hohen Überschusses an Kieselgel die Verluste durch Adsorption relativ niedrig sind. Die Auswirkung der Oberflächenadsorption an der Glaswandung dürfte, verglichen mit dem Einfluß der Sorbensoberfläche, bei den resultierenden, konzentrierten Lösungen sehr gering sein.

+) Firma Varian, Darmstadt

++) Bodenseewerk Perkin Elmer, Überlingen

Als Hauptursache für die guten Extraktionsraten wird die hier günstigere Desorption durch die polare wässrige Phase angesehen; im Gegensatz zum einphasigen Ablösen mit organischen Lösungsmitteln.

Da bei den obigen Extraktionsbedingungen davon ausgegangen werden kann, daß das Dissoziationsgleichgewicht der schwachen Basen völlig zugunsten der nichtionogenen Form liegt, erlaubt die günstige Verteilung eine Konzentration im Extraktionsgemisch. Für die praktische Trennung kann davon ausgegangen werden, daß der NERNSTsche Verteilungssatz bei nicht dissoziierten, organischen Molekülen bis in den Bereich von 0,1 Mol/Liter in ausreichendem Maße erfüllt ist. Bei einem mittlerem Molekulargewicht der Basen von 150-200 würde sich eine Gültigkeit bis zu Konzentrationen von 15-20 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ergeben. Derart hohe Substanzmengen werden jedoch nicht erreicht.

Die gefundenen günstigen Ausbeuten geben Anlaß, diese Mikroverteilung in das Analysenschema einzubauen. Die Durchführung der GC aus definierten Zonen des Plattenmaterials gewährleistet eine sichere Zuordnung von RRT- und Rf-Werten. Besonders bei Anwesenheit mehrerer Substanzen bewirkt die Kopplung der beiden, nach unabhängigen Parametern arbeitenden Verfahren, einen hohen Aussagewert der gewonnenen Information.

3.4. Versuche zu einem Gesamttrennungsgang aus biologischem Material

Neben der Vielzahl an Einzelnachweisen für verschiedene Dopingmittel werden in der Literatur, lediglich stark verkürzte, Analysengänge beschrieben. Jedoch wird bei diesen Verfahren nur eine begrenzte Zahl von Stoffen berücksichtigt. Häufig sind sie auf die rasch durchführbare gaschromatographische, sehr empfindliche Untersuchung auf flüchtige Basen abgestellt. So führen BECKETT u. Mit. (17) in ihrer grundlegenden Arbeit daneben lediglich ein DC-Screening auf Strychnin durch. Im Gegensatz dazu scheint - wie Erfahrungen zeigen - der Einsatz von Dopingmitteln Modeströmungen unterworfen zu sein. Insbesondere durch die starke psychische Belastung der Athleten dürfte die Eigenmedikation und Therapie mit Substanzen außerhalb der Gruppe der Stimulantien eine Rolle spielen. In dem angestrebten Analysengang mußten deshalb sowohl die flüchtigen Basen aus der Reihe der Stimulantien mit der bei Einzeluntersuchungen erreichbaren Empfindlichkeit erfaßt werden, gleichzeitig durfte die Möglichkeit, auf andere bisher in der Dopingliteratur nicht oder nur selten erwähnten Stoffe, z. B. sedierende Mittel, zu prüfen, nicht eingeschränkt werden.

3.4.1. Trennschema

Die bisher erarbeiteten Variationen der Anreicherung und Isolierung sowie die Kopplung der DC-GC lassen sich in einen für die allgemeine Untersuchung von Proben mit geringem Fett- und Proteinanteil angewendeten Analysengang (Abb. 18) einbauen. Arbeitsvorschriften zur Gewinnung der Extrakte siehe 3.5.1.

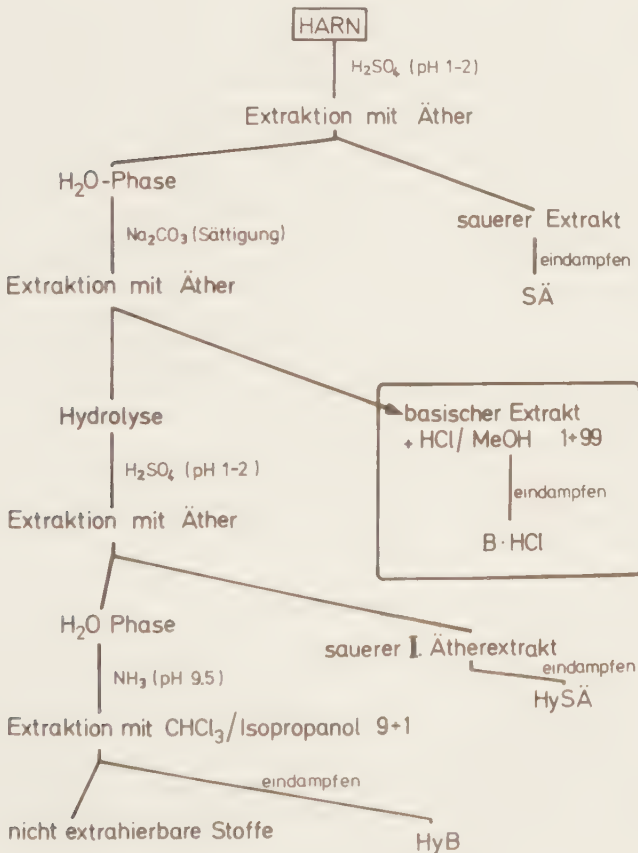


Abb. 18: Extraktionsschema des Gesamttrennungsganges

Da das Schema auf eine allgemeine Arzneimittelanalyse aus biologischem Material ausgerichtet ist, ist es mit den Aufarbeitungen für die Dopinganalyse nicht vergleichbar. Es lehnt sich vielmehr z.T. an die Variationen des Trennungsganges nach STAS-OTTO für Arzneimittel an. Es entspricht der von BAMANN u. ULLMANN (6) angegebenen Aufarbeitung zu drei Hauptgruppen, während MÜHLEMANN u. BÜRGIN (95) nach Äther- und Chloroformextraktion der schwefelsauren Probe noch weinsauer mit Chloroform extrahieren. WINTERFELD (146) isoliert die Purinkörper nach vorausgegangener Extraktion mit Äther und Chloroform aus schwefelsaurem Milieu mit Chloroform-Isopropanol 3:1 und extrahiert anschließend nochmals weinsauer. Auch AUTERHOFF (4) verteilt nochmals nach Ätherextraktion bei pH 1 mit Chloroform im weinsaureren Milieu.

Im Gegensatz zu diesen vier Autoren, deren Isolierungsvorschläge auf die Trennung von Arzneistoffmischungen im 100 mg Maßstab ausgerichtet sind, erfolgte, wie bereits erwähnt, eine Aufgliederung des sauren Gesamtextraktes in Untergruppen nicht. Der Nachteil unweigerlich auftretender Substanzverluste überwiegt, neben dem erhöhten Zeitbedarf, den durch den Anfall in einer Untergruppe gewonnenen Hinweis. Extrakte mit Reinheitsgraden, die eine Anwendung von summarischen Verfahren wie IR-Spektrophotometrie oder etwa eine Mikroschmelzpunktbestimmung zuließen, sind jedoch auch in den Untergruppen nicht zu erwarten. Für die chromatographischen Screeningverfahren lassen sich die anfallenden Gruppenextrakte gut einsetzen. Auf Grund der weitaus geringeren Konzentrationen (um den Faktor 10^3) sind die bei Mehrfachextraktion mit Äther erzielten Ausbeuten in der Regel gut. Die häufig bei der Extraktion von organischem Material mit Chloroform auftretenden, sehr stabilen Emulsionen und die Möglichkeit der Ionenpaarextraktion der Basen in saurem Milieu, ließen vom Einsatz von Chloroform mit Ausnahme der Gewinnung der Fraktion HyB absehen.

Im Gegensatz zu der für pharmazeutische Analysen gedachten Aufarbeitung wird das organische Probenmaterial jedoch einer Hydrolyse zur Spaltung der Paarlinge unterzogen, die je nach Ausführung (Säure oder Fermente⁺⁾) verschiedene Endprodukte ergeben kann.

3.4.1.1. Aufarbeitung der Fraktionen

Von den nach 3.5.1. erhaltenen Extraktionsrückständen wird der mit SÄ bezeichnete saure Extraktionsrückstand nach dem Lösen in wenig Chloroform:Methanol 8:2 dünnstichchromatographisch nach MACHATA (88) untersucht. Daneben werden die Fließmittel Chloroform:Aceton 90:10 nach (11) und Chloroform:Diäthylamin 90:10 nach (137) verwendet. Zur Detektion werden bevorzugt Quecksilber(I)nitrat und die Chlorbenzidinreaktion (133) herangezogen. Außerdem wird gaschromatographisch auf einer 1 % OV-17 Säule bei 180°C und 230°C geprüft (Länge der Glassäule: 4 Fuß).

⁺) Gemisch aus Sulfatase und Glucuronidase nach BEYER (21)

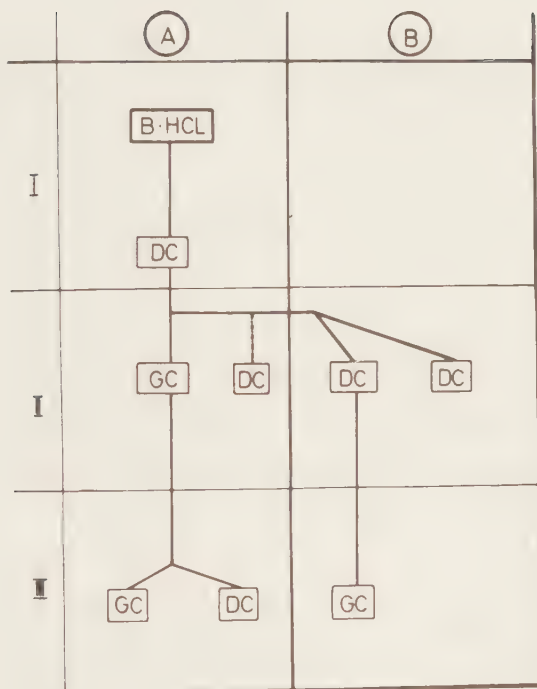


Abb. 19: Aufarbeitung der B·HCl-Fractionen

Stehen 15 ml Harn oder weniger zur Verfügung, erfolgt die Aufarbeitung nach der mit A bezeichneten Spalte des Schemas. Bei größeren Probenmengen werden zusätzlich die in der Spalte B verzeichneten Operationen durchgeführt. Beim Screening (Reihe I) wird der 15 ml Harn entsprechende Extraktanteil (nach 3.5.1.) im Fließmittel 12 entwickelt und nach 3.2.1.5. besprüht. Bei größeren Ausgangsprobenmengen werden Anteile aus allen Extrakten mitchromatographiert, um das Auftreten einer Substanz in mehreren Fraktionen zu erfassen und besser bewerten zu können. Ein Teil des Extraktes SÄ und HyB wird jedoch stets zum Vergleich mitgeführt.

Werden bei der Detektion keine basischen Substanzen angezeigt, entfällt eine weitere Untersuchung. Verläuft die Übersichtsanalyse auf basische Verbindungen positiv, so werden nach Zeile II (Abb. 19) Identifizierungsverfahren angeschlossen. Bei Probenmengen ≤ 15 ml wird nach der Aufarbeitung nach 3.5.3. gaschromatographisch auf der Apiezon L/KOH und Se-30 Säule (Bedingungen siehe Tab. 8) geprüft. Die Stärke der DC-Farbreaktion bestimmt,

ob die extrahierte Substanz nur für mehrere GC Prüfungen ausreicht oder in einem weiteren geeigneten DC-System (Tab. 6) eingesetzt werden kann.

Bei größeren Ausgangsmengen werden weitere DC-Systeme, gegebenenfalls mit anderen Sprühreagenzien nach 2.2.1.2., pro 15 ml Harn eingesetzt. (Fließmittel Nr. 24a ist nach Nr. 12 geeignet.) Jedoch bestimmen die gefundenen hRf-Werte die noch zu wählenden Mischungen.

Zur Bestätigung werden nach III (Abb. 19) Anteile aus der DC-Aufarbeitung unter anderen gaschromatographischen Bedingungen analysiert, wobei auch Derivatisierung nach 2.2.2. möglich ist. Bei hohen Detektorsignalen können diese Proben mit der verdünnten Lösung der ersten DC-GC Aufarbeitung ausgeführt, ansonsten muß erneut eine DC-Zone extrahiert werden.

Die nach 3.5.1. erzielten Extrakte nach der Hydrolyse HySä und HyB werden besonders auf Spaltprodukte der Benzodiazepinreihe und auf Phenolbasen dünn-schichtchromatographisch untersucht. Für die Basen werden neben der Detektion nach 3.2.1.5. u.a. Marquis- und Paulys-Reagenz herangezogen. Die Trennung der Basen ist in den eingesetzten Fließmitteln möglich (Tab. 5). Für die Basen der HyB ist vor der gaschromatographischen Prüfung in der Regel eine Derivatisierung der phenolischen Hydroxylgruppe, z.B. Trimethylsilylierung, nötig.

3.4.2. Störungen bei altem Probenmaterial

Um die praktische Anwendbarkeit des durch Kopplung der Teilschritte vorgesehenen Analysenweges zu erproben, sollte nach Zusatz definierter Mengen zu Leerharn analysiert werden. Dies schien geeigneter, als eine Verabreichung der einzelnen Substanzen in therapeutischen Dosen an Probanden und anschließende Untersuchung des Harnes, da durch die Varianz der Ausscheidung keine feste Koordination der Harnkonzentration zur eingenommenen Menge besteht.

Es wird berichtet, daß sich in unsachgemäß gelagerten Proben häufig Substanzen nachweisen lassen, die geeignet sind, die Analyse, insbesondere die GC-Prüfung zu stören (10, 72). Deshalb wurde der Harn vor dem Versuch eine Woche bei Zimmertemperatur gelagert. Diese "Ausgangsmatrix" kommt dem in der gerichtsmedizinischen Toxikologie in der Regel anfallenden Probenmaterial nahe.

In Anlehnung an die in Abschnitt 3.1.1. und 3.3.2. gefundenen Ausbeuten bei der Anreicherung und Aufarbeitung und die unter 3.2.1.5. beschriebene Empfindlichkeit der Detektion wurde der Gesamtgang an drei Substanzen erprobt.

Zu je 15 ml Harn (pH 1-2) wurden 2 µg Propylhexedrin und 2 µg Dimethylamphetamin bzw. Äthylamphetamin als Salz zugefügt, dreimal mit 15 ml Äther im Scheidetrichter extrahiert und die saueren, stark gefärbten Ätherextrakte verworfen. Nach dem Alkalisieren mit festem Natriumkarbonat wurden nach 3.1.1. die Extrakte B·HCl in Abdampfschalen (Durchmesser 3 cm)

gewonnen. In wenig Methanol gelöst wird mit einer Pasteurpipette möglichst quantitativ unter Verwendung eines Fönes auf eine DC-Platte gebracht und im Fließmittel Methanol:Ammoniak (Tab. 5) entwickelt. Vergleichssubstanzen und Leerharnextrakt liefen auf der gleichen Platte. Bei der Detektion nach 3.2.1.5. erschienen nur unspezifische, diffuse Färbungen in den Harnextrakten, die in allen - incl. Leerwert - übereinstimmten. (Diese Störung war bei Routineuntersuchungen bisher nicht in dem Maße in Erscheinung getreten.)

Bei Steigerung der zugesetzten Menge auf 5, 10 und 20 μg zu je 15 ml Harn (nach 14tägiger Lagerung) ergab sich das gleiche negative Resultat. In Höhe der mitchromatographierten Vergleichssubstanzen waren keine bevorzugt reagierenden Zonen auszumachen. Es wurden jedoch in allen Extrakten einschließlich Leerwert starke Farbzonen erhalten, die eventuell die Färbung der zugesetzten Substanzen überdecken konnten. Zur Prüfung dieser Vermutung wurde das Sorbens in Höhe der Vergleichssubstanzen abgeschabt und nach der Methode 3.3.2. untersucht. Es ergab sich bei 10 μg Zusatz kein den zugesetzten Substanzen zuzuordnender Peak.

Bei dem Versuch zeigte sich, daß ein quantitatives Lösen und Übertragen des gesamten Extraktes auf einen eng begrenzten Startflecken unmöglich war. Um diese Schwierigkeit und die damit verbundenen Verluste zu umgehen, wurde folgender Versuch durchgeführt:

4 μg Dimethylamphetamin (4 μl einer wässrigen Lösung mit 1 mg/1 ml) als Hydrochlorid werden in 15 ml Wasser wie oben, der saueren und basischen Verteilung unterzogen. Die $\text{B} \cdot \text{HCl}$ -Fraktion wird ohne Trocknen der Ätherphase auf dem Sandbad (50°C) in einer Schale gewonnen. Der Extrakt wird mit zweimal 2 ml Methanol in einen Schliffkolben (10 ml) mit spitz ausgezogenem Boden gespült und am Rotavap nach BÜCHI eingengt. Da wegen Substanzverlusten wirkungsvolle Siedehilfen ausgeschlossen waren, wurde bei 50°C auf ca. 20 μl im Luftstrom abgedunstet. Die gesamte verbleibende Lösung wurde zur Dünnschichtchromatographie verwendet. Es zeigte sich bei der Detektion nach 3.2.1.5. ein deutlicher Flecken in Höhe der mitgeführten Vergleichssubstanz. Nach der Aufarbeitung nach 3.5.3. ergab sich ein gut auswertbarer Peak mit der für Dimethylamphetamin entsprechenden Retentionszeit.

Es war also ausgeschlossen, daß die Verluste durch die Verteilung und Übertragung nach dieser Variante in Bereiche unter der Nachweismöglichkeit führen. Im nächsten Ansatz wurden dann je 4 μg Dimethylamphetamin, Äthylamphetamin und Propylhexedrin in 30 ml Harn aufgearbeitet. Jedoch wurden die anfallenden basischen Ätherextrakte nach dem Trocknen mit methanolischer Salzsäure 0,12 N versetzt, in Spitzkolben (100 ml) eingengt. Es wurde bei 30°C Wasserbadtemperatur Luft durchgesaugt, damit die Mischung nicht zum Sieden kam. Um gegen Ende des Einengungsvorganges die Ober-

fläche noch wirkungsvoll zu belüften, war ein Reduzierstück an der Luftzu-
leitung angebracht worden (Abb. 20). Je nach Bedarf wird die Kapillare
(c) weiter in das Belüftungs- und Ansaugrohr (b) des Rotationsverdampfers
geschoben oder herausgezogen.

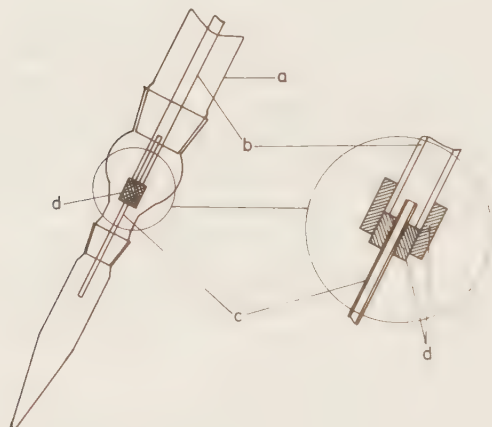
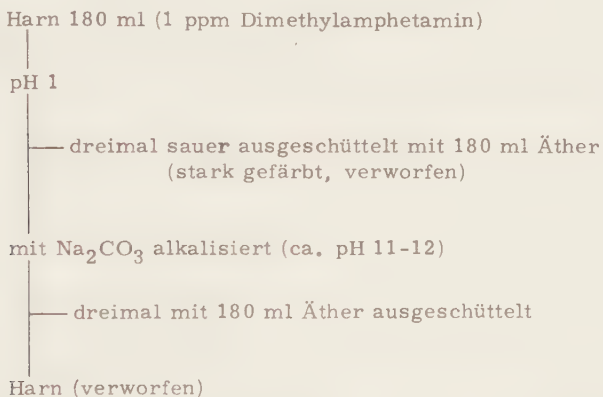


Abb. 20: Variation am Rotavap nach BÜCHI

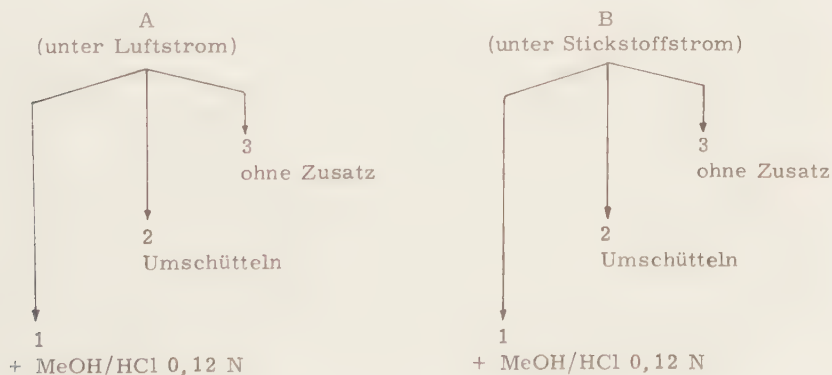
- a Ansatzstück für Destillationskolben
- b serienmäßiges Belüftungs- und Ansaugrohr
- c Glasrohr mit ca. 3 mm Durchmesser
- d Verbindung aus zwei ineinanderpassende Siliconschlauchstücken

Der trockene Kolben wurde in ein Eisbad eingestellt und 30 μ l Methanol eingesprüht. In Abständen von einigen Minuten wurde der verschlossene Kolben zur Befeuchtung der Wandung horizontal gedreht. Da sich die Kolben nicht zentrifugieren ließen, wurde durch Abschleudern und längeres Einstellen in das Eisbad versucht, die Flüssigkeit in der Spitze anzusammeln. Es zeigte sich, daß mit der geringen Lösungsmittelmenge der Extrakt - auch beim Übergang zu Kolben mit nur ca. 20 ml Inhalt - nur sehr unvollständig zu lösen war, besonders da sich die Kolbenwände schwer benetzen ließen. Die resultierende Lösung wurde mit einer Kapillare für die DC-Prüfung entnommen. Nach der Entwicklung ergab sich wieder das gleiche Bild. Starke, schon vor der Detektion gefärbte, bräunliche ausgedehnte Zonen stellten sich in Höhe der Vergleichssubstanzen dar.

Um abzuklären, ob die teilweise säulenförmig auftretenden Zonen äthergängige Harnbestandteile des "unsachgemäß" gelagerten Harnes darstellen, die bei der extrem hohen Dosierung pro Startfleck (30 ml Harn) besonders in Erscheinung traten, ob es sich um Artefaktbildung in den Extrakten bei der gewählten Einengung nach Säurezusatz handelte oder, ob etwa beim Abdunsten Oxydationsvorgänge durch die übergeleitete Luft eintreten, wurden 180 ml Harn mit einer Dimethylamphetamin-Konzentration von 1 ppm (= 180 µg Gesamtmenge) nach folgendem Schema aufgearbeitet:



Die vereinigten Ätherextrakte wurden über Na₂SO₄ getrocknet und auf 600 ml aufgefüllt. Je 100 ml wurden wie folgt aufgearbeitet:



Beim Einengen der Extraktanteile A1, 2, 3 wurde zum Abdunsten ungereinigte Luft angesaugt, während bei B1, 2, 3 Stickstoff eingeblasen wurde.

Beim Umschütteln wurde wie folgt vorgegangen:

Der Ätheranteil wurde mit zweimal 2 ml H_2SO_4 (0,1 N) ausgeschüttelt, die wässrige Phase mit Natriumkarbonat gesättigt und erneut dreimal mit je 5 ml Äther verteilt. Der neu anfallende Extrakt wurde mit 0,25 ml Methanol-Salzsäure ungetrocknet einrotiert.

Die gewonnenen Extrakte wurden möglichst quantitativ auf DC-Platten übertragen. Nach der Entwicklung im Fließmittel Nr. 12 und Besprühen nach DRAGENDORFF mit anschließender Säurebehandlung ließ sich folgendes feststellen:

1. Während bei A und B in den Fraktionen 1 und 3 starke Störsubstanzzonen, die sich mengenmäßig entsprachen, auftraten, waren diese Substanzen in den beiden Fraktionen 2 weitaus geringer.
2. Bei visueller Auswertung zeigte sich, daß die Variation 3 die geringste Wirkstoffmenge erbrachte, während bei A1, 2 und B1, 2 keine Unterschiede bemerkt wurden.

Damit war ausgeschlossen, daß die auftretenden Störsubstanzen durch die Aufarbeitung bedingt waren; es handelt sich vielmehr um extrahierbare Stoffe aus dem gelagerten Material.

Bei einer Wiederholung der Versuchsreihe wurde als zusätzliche Variante das Waschen des basischen Ätherextraktes mit 50 ml 10%iger Na_2CO_3 -Lösung durchgeführt; als Vergleich dienten die Verfahren 1 und 2 von oben. Dabei wurde eine Verringerung der "Stör"-substanzen beobachtet, jedoch war der Reinigungseffekt schwächer als beim Umschütteln. Eine Ausbeuteverminderung an Dimethylamphetamin war optisch nicht feststellbar.

Es war jedoch denkbar, daß bei Stoffen mit ungünstiger Verteilung durchaus merkbare Verluste eintreten konnten, deshalb wurde darauf verzichtet, die gewonnenen Ätherextrakte vor dem Einengen mit größeren Mengen wässriger Phase zu waschen. Als unzulänglich war bisher noch das Übertragen der Eindampfrückstände zur DC anzusehen. Für die DC waren die auftragbaren Flüssigkeitsmengen begrenzt. Andererseits war es aber schwierig, mit 20-40 μl Methanol aus den relativ großen Spitzkolben^{+) (50 ml)} den Extrakt herauszulösen, auch war es nicht möglich, die Lösung durch Zentrifugation in der Spitze gut zu sammeln.

Bei Einsatz von 50-300 μl Äther/Methanol (1:1 V/V) und teilweiser Entnahme erhöhte sich erwartungsgemäß die Nachweisgrenze. Trug man die gesamte Lösung auf, war neben Kraterbildung im Sorbens zu bemerken, daß die Rf-Werte zum Teil von denen der mitchromatographierten Vergleichssubstanzen abwichen. Dies ist vermutlich auf die hohe Salzkonzentration zurückzuführen, denn wie Tab. 4 zeigt, hatten aufgetragene Salze und die freie Base in den verwendeten Fließmitteln gleiche Rf-Werte. Beim Übergang von lufttrockenen Platten zu höheren Aktivitätsstufen, störten die Extraktivstoffe des gealterten Harnes sehr, da sie teilweise hRf-Werte von 50-90 aufweisen konnten.

+) Bei Verwendung von Kolben bzw. Reagenzgläsern mit 15-30 ml Inhalt erwies sich das Absaugen als langwierig, da jeweils nur geringe Extraktanteile aufgegeben werden konnten.

Bei der bisherigen unbefriedigenden Übertragung der Extrakte nach der Anreicherung auf Dünnschichtplatten war eine Aufarbeitung des Rohextraktes unumgänglich.

Bei weiteren Versuchen erfolgte dazu das Einengen des basischen Ätherextraktes nach Zugabe methanolischer HCl (0,12 N) durch Eintropfen in ein auf dem Wasserbad temperiertes Zentrifugenglas mit Schliff und spitz ausgezogenem Boden.

Das Trocknen der Extrakte über Natriumsulfat konnte unterbleiben, weil sich erwiesen hatte, daß der Großteil der aufgetretenen Störsubstanzen nicht im Wasser- bzw. Harnanteil des ungetrockneten Ätherextraktes enthalten war. Außerdem beeinflussten ungetrocknete Extrakte (3,1.1.) die Wiederfindungsraten nicht. Bei einer Badtemperatur von 50°C werden ohnehin trockene Extraktückstände erhalten.

Die zur Verteilung verwendeten Scheidetrichter mit Teflonküken erwiesen sich zum Eintropfen als recht ungünstig, da die eingestellte Tropfenzahl nicht gehalten wurde. Die Verwendung von Flachscliffhähnen aus Glas⁺⁾ hat sich zu diesem Zweck sehr gut bewährt.

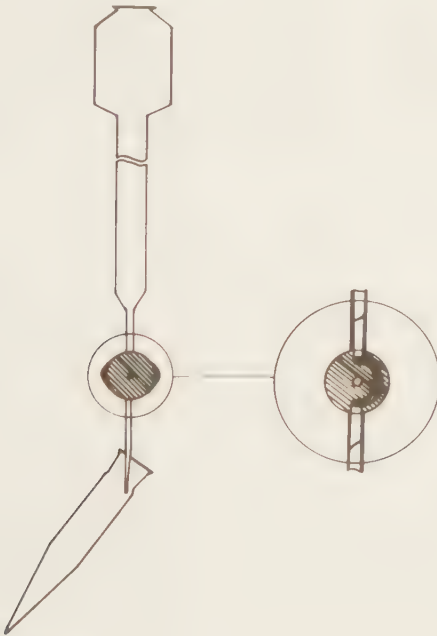


Abb. 21: Abtropfschema mit Flachscliffhahn

⁺⁾ Firma Hecht, Sondheim/Rhön

Der Einsatz einer thermostatisierten Glaswanne ermöglicht eine visuelle Kontrolle beim Einstellen einer Tropfgeschwindigkeit, bei der sich am Boden des Spitzglases eben keine Flüssigkeit ansammeln soll (Arbeitsvorschrift 3.5.1.).

Auch bei den verwendeten Zentrifugenspitzgläsern war es nicht möglich, den Extrakt in 10-20 μl eines Lösungsmittels quantitativ zu lösen. Aus diesem Grund wurde eine Einmalverteilung zwischen NaOH 10 % und Chloroform durchgeführt. Neben der Möglichkeit der quantitativen Entnahme sollte dieser Schritt eine zusätzliche Reinigung des Extraktes bringen. Dabei wurde gerade soviel wässrige Phase eingesetzt, daß bei Vibration mit dem Mikromixer die gesamte Innenfläche gut benetzt wurde, aber möglichst geringe Verluste durch die Verteilung auftraten. Als organische Phase wurde, wegen der guten Löslichkeit organischer Substanzen und des spezifischen Gewichtes, Chloroform (20-30 μl) eingesetzt. Nach dem Abzentrifugieren ließ es sich gut aus den Spitzen entnehmen (vergl. 3.5.2.).

Zur Überprüfung der Wirksamkeit des vorgesehenen Reinigungsschrittes wurde folgender Versuch durchgeführt:

Zu 90 ml gelagerten Harn wurden 18 μg (= 0,2 ppm) Methamphetamin und 12 μg (= 0,13 ppm) Prolintan als Hydrochloride gegeben. Nach dem Ansäuern (pH 1-2) wurde nach 3.5.1. extrahiert. Die saure Ätherfraktion wurde verworfen, die gesammelten basischen Fraktionen auf 300 ml mit Äther ergänzt. Je 1/6 wurde zur B·HCl-Fraktion nach 3.5.1. in einem Zentrifugenspitzglas eingengt. Je 3 Proben wurden anschließend

a) mit 0,5 ml NaOH 10 % und 20 μl Chloroform einer Einmalverteilung unterzogen

b) in wenig Methanol gelöst.

Die Lösungen wurden quantitativ auf je einen Startpunkt übertragen, im Fließmittel 12 entwickelt und nach 3.2.1.5. besprüht.

Obwohl auch die nach a) aufgearbeiteten Chloroformlösungen schwach gefärbt waren, zeigte sich bei der Detektion der starke Reinigungseffekt der zweiten Verteilung. Die mit den gereinigten Extrakten erhaltenen Farbzonen waren weitaus geringer, eng begrenzt und dadurch war das Erkennen der Farbreaktion bei der Detektion in keiner Weise gestört. Eine unterschiedliche Ausbeute konnte visuell nicht bemerkt werden. Bei weiteren Versuchen im gleichen Konzentrationsbereich waren die jeweils zugesetzten Substanzen gut anfärbbar. Die vorher zum Teil aufgetretenen Unterschiede der Rf-Werte zwischen Vergleichssubstanz und Wirksubstanz in der Analyse, wie sie z.B. auch von BERRY u. GROVE (20) und MULE (97) beschrieben werden, wurden nicht mehr beobachtet. Dies spricht für die Vermutung, daß es sich bei der Verschiebung um Salzeffekte handelt.

Auch bei Beladung eines Startpunktes mit dem Extrakt aus 30 ml Harn waren die auftretenden Farbzonen von geringer Ausdehnung und unterschieden sich von den nachzuweisenden Pharmaka durch ihre Farbe vor und während der durchgeführten Detektionsschritte. Stammte der Ausgangsharn von Kaffeetrinkern, wurden trotz der für Coffein ungünstigen Verteilung

(nach vorgegangener saurerer Extraktion mit Äther) auch bei Einsatz von 15 ml Harn, starke Coffeinflecken erzielt, deren Intensität als Orientierung für Verluste bei der Aufarbeitung benutzt wurde.

Bei der Gaschromatographie der oben erhaltenen gefärbten Zonen nach 3.3.2. ergaben sich gut verwertbare Peaks, deren Retentionszeiten mit denen der Vergleichssubstanzen übereinstimmten. Die entsprechenden Zonen des Leerharnserbrachten diese Signale nicht.

Versuche, in den gefärbten Chloroformextrakten vor der DC gaschromatographisch den Wirkstoff zu bestimmen um die Verlustrate zu ermitteln, erwiesen sich als unmöglich. Die quantitative Bestimmung der Wirksubstanz aus den hahnenkammförmigen Kurven war nicht durchführbar. Bereits eine qualitative Zuordnung bereitete teilweise Schwierigkeiten. Diese Störung durch altes Probenmaterial dürfte die direkte GC aus den anfallenden Extrakten, die nach einer Reihe der unter 2.1. erwähnten Verfahren durchgeführt wird, unmöglich machen.

3.4.3. Mögliche Schwierigkeiten durch den Wirkstoff

Nachdem die Störungen durch Bestandteile des gelagerten Harnes beseitigt waren, wurde an Beispielen der in der B·HCl-Fraktion anfallenden Substanzen das Verfahren geprüft. Es wurden in der Regel gute Resultate bei Abtrennung und Nachweis erhalten, jedoch konnten einige Substanzen nicht wiedergefunden werden. Diese Schwierigkeiten werden in den nachstehenden Versuchen überwunden.

3.4.3.1. Gut wasserlösliche Verbindungen

Bei Additionsversuchen mit Heptaminol konnte bis in den Bereich von 30 µg Base/15 ml Harn bei der DC des basischen Extraktes, unter Berücksichtigung der unter 3.4.2. erzielten Reinigung und Verbesserung der Extraktübertragung, im Fließmittel 12 keine vom Leerharnextrakt gut zu unterscheidende Färbung mit β-Natriumnaphthochinon-4-sulfonat in Höhe des mitgeführten Vergleiches erzielt werden. Insbesondere in den länger gelagerten Harnen ergaben sich mit Jod nach der Schwefelsäurebesprühung mehr oder weniger deutlich gefärbte Zonen in Höhe des Vergleiches. Die GC-Prüfung dieser Zonen nach der Aufarbeitung verlief negativ. Auch wenn man davon ausgeht, daß die in Tab. 7 angeführten Werte für die Empfindlichkeit der DC-Detektion mit reinen, relativ konzentrierten Lösungen (2 µg/µl) unter matrixfreien Bedingungen, d.h. mit einem indifferenten Untergrund beim Besprühen erzielt wurde, waren diese offensichtlichen Substanzverluste Anlaß, die Teilschritte des Aufarbeitungsschemas für Heptaminol durchzuprüfen.

Um eine mögliche Zersetzung während der Detektionsfolge auszuschließen, wurden Startpunkte mit 50 µg Base nach der Entwicklung im Fließmittel 24a und der Detektion zur GC in Schmelzpunktröhrchen nach 3.3.2. aufgearbeitet. Aliquote wurden, mit der analog verteilten Menge ohne DC-Passage

als Vergleich, auf eine Säule mit 2 % Carbowax 20 M 5 % KOH von 3 Fuß Länge am GC-Gerät 1740 injiziert (übrige Parameter Tab. 2). Es wurden dabei um 60 % der eingesetzten Menge (bezogen auf die analoge Verteilung) zurückgewonnen. Nach der Reduzierung der aufgetragenen Menge auf 5 µg Base ging der Mittelwert auf 40 % zurück. Es fällt hierbei jedoch auf, daß das Detektorsignal bei der theoretisch eingesetzten Menge von 0,5 µg/µl, verglichen mit den aus der Amphetamin- und Ephedrinreihe erzielten Werten, niedrig ist.

Es zeigt sich bei der gewählten Temperatur von 110°C trotz niedriger Retentionszeit (2,4 Minuten nach der Lösungsmittelfront) bereits erhebliches Tailing bei breiter Peakform. Durch Erhöhung der Trenntemperatur konnte diese Störung beseitigt werden. Bei 150-155°C Ofentemperatur wurde schließlich ein scharfer Peak erzielt, dessen Retentionszeit (0,5 Minuten nach dem Lösungsmittel) noch eine gute Trennung vom Lösungsmittelpeak gewährte. Die auch in der Mitteilung der Firma DELALANDE (46) festgestellte geringe Zersetzung auf der verwendeten Säule erschwerte die Auswertung nicht, da sie in gleichbleibendem Verhältnis auftrat.

Die erzielten niedrigen Detektorsignale wurden auf eine ungünstige Verteilung infolge der vergleichsweise guten Wasserlöslichkeit, die sich auch aus der Struktur erklären läßt, zurückgeführt. Diese Annahme wurde durch den negativen Befund bei einer Verteilung, wie sie als Vergleich für die gaschromatographische Ausbeutenbestimmung unter 3.1.1. verwendet werden, bestärkt. 1 µl der organischen Phase der Ausschüttelung 100 µg Heptaminolbase, 2,0 ml 0,1 N HCl, 0,5 NaOH 2,5 N und 50 µl Chloroform brachte bei der Elektrometereinstellung 10^{-11} amps/mV und der Abschwächung 1/8 kein verwertbares Signal.

Als Vergleich für weitere Versuche wurde zunächst eine Lösung mit einem gravimetrischen Gehalt von 5 µg freie Base pro µl hergestellt.

265 mg Heptaminolhydrochlorid werden in 100 ml Wasser gelöst. Nach dem Alkalisieren mit 1 g festem Natriumkarbonat wird dreimal mit je 100 ml Diäthyläther, peroxidfrei, durch 5minütiges Schütteln verteilt. Die gesammelten Extrakte werden über Nacht mit Natriumsulfat getrocknet. Nach dem Abdunsten bei Raumtemperatur verbleibt ein Rückstand von 75 mg (= 24 % des Einsatzes). 25 mg der zähen farblosen Flüssigkeit werden mit Chloroform zu 5 ml gelöst.

Ein Ausbeuteversuch mittels GC analog 3.1.1., jedoch mit 4 mg Baseneinsatz pro 100 ml H₂O, bestätigte die ungünstigen Extraktionsverhältnisse. Gaschromatographisch konnte ohne Säurezusatz 10 %, mit HCl-Zusatz 30 % bestimmt werden. Bei weiteren Versuchen fiel auf, daß bei Verteilung von 1 mg Wirkstoff in einer Mischung aus 2,0 ml 0,1 N HCl und 0,5 ml 2,5 N NaOH bei 100 µl Chloroform als organische Phase die Abschwächung am Elektrometer um den Faktor 32 zurückgenommen werden muß, um Signale vergleichbarer Größenordnung zu erzielen, wie sie bei dem Ansatz 1 mg Wirkstoff 0,3 ml 2,5 N NaOH ebenfalls bei 100 µl Chloroformphase erzielt werden.

Es interessierte nun, wie die Gewinnungsrate an die pH-Verhältnisse und das Mengenverhältnis organische Phase/wässrige Phase geknüpft ist.

Es wurden 0,1 M Glycin/NaOH-Puffer nach SÖRENSEN von pH 10-13 in Intervallen von 0,5 hergestellt (Einstellung mit der Glaselektrode), 0,2 ml einer wässrigen Heptaminolösung mit einem Gehalt von 1 mg Base als Hydrochlorid jeweils mit 0,3 ml Pufferlösung und 100 μ l Chloroform versetzt und zweimal 1 Minute durch Anlegen an den Mikromixer agitiert. Nach dem Zentrifugieren wurde jeweils 1 μ l in den Gaschromatographen injiziert. Analog wurde mit Natronlauge von 0,1-2,5 N und Natriumcarbonatlösungen steigender Konzentration verfahren.

Abb. 22 zeigt die Mittelwerte der erzielten Peakhöhen.

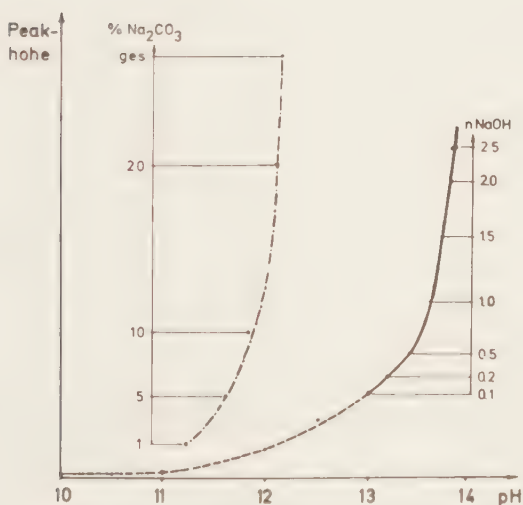


Abb. 22: Verteilung von Heptaminol

Gerät: GC Varian 1740; Säule: 3 Fuß, 2 % Carbowax 20 M/KOH 5 %, Temp. 150°, Injektionsteil 200°, Detektor 225°C, N₂ 25 ml, Luft 250 ml, H₂ 25 ml/min.

- gegen Natriumcarbonatlösung
- .-.-.-.- gegen Pufferlösung
- gegen NaOH verteilt

Für die Pufferlösung erhöht sich im Bereich pH 10-11,5 die Extraktionsrate sehr geringfügig. Von pH 11,5-13 nimmt die Ausbeute stärker zu, um anschließend für Natronlauge zunehmender Konzentration fast senkrecht anzusteigen.

Die Werte mit Sodalösung steigender Konzentration als Verteilungsmedium zeigen, daß für den äußerst steilen Anstieg der Umsatzrate neben dem pH-Wert Aussalzeffekte weit stärker verantwortlich sind. Dies macht deutlich, daß bei der Isolierung von Stoffen mit ungünstiger Verteilung der Einsatz von höheren Konzentrationen an Natriumkarbonat als Alkalisierungsmittel wirkungsvoller ist als z. B. Natronlauge niedriger Molarität. Aus der Steilheit der Kurve folgt die Forderung nach exakter Einhaltung gewählter Bedingungen auch für qualitative Aussagen. Bei Kaliumchloridzusätzen von 1-20 % (G/G) zu 0,1 M Glycin/NaOH Pufferlösungen konnte der exponentielle Anstieg der Extraktionsrate nicht beobachtet werden. Wie die in Abb. 23 aufgetragenen Mittelwerte zeigen, bleibt der Anstieg linear. Bei

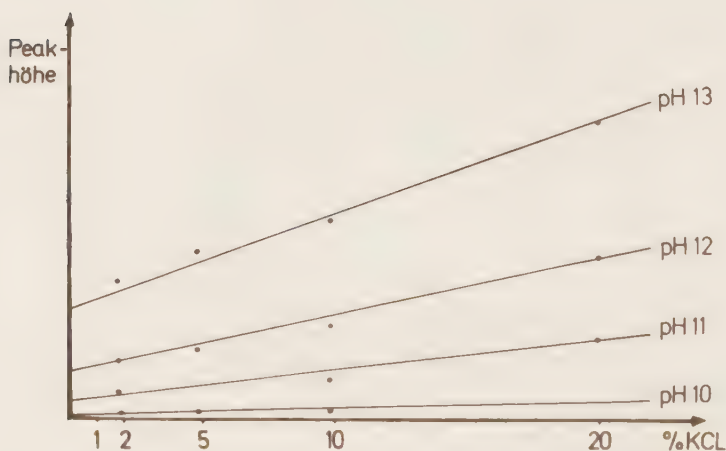


Abb. 23: Verteilung von Heptaminol gegen Glycinpuffer mit steigendem KCl-Zusatz

steigendem pH-Wert des Puffers nimmt die Steilheit des Anstieges zu. Dieses Ergebnis zeigt, daß der Zusatz von Kaliumchlorid zur basischen Extraktionsflüssigkeit, wie sie die Firma DELALANDE (46) in ihrer Mitteilung angibt, für die Isolierung von Heptaminol nicht optimal ist. Durch die dort durchgeführte mehrstündige kontinuierliche Extraktion dürfte dies jedoch ausgeglichen werden.

In einem Vorversuch zur gaschromatographischen Erfassung der Ausbeuteverhältnisse (3.1.1.) war bei einer Verteilung gegen steigende Mengen an 2,5 N NaOH (0,2; 0,4; 1,0 ml bei 20 μ l Chloroformeinsatz) für Äthylamphe-tamin keine Verringerung der Ausbeute festgestellt worden. Am Heptaminol ergab sich bei der Variation der Menge an Natronlauge für die Verteilung gegen Chloroform und das benutzte Extraktionsgemisch Chloroform/Äther (1:1) untenstehender Verlauf der Verteilungsraten in der organischen Phase.

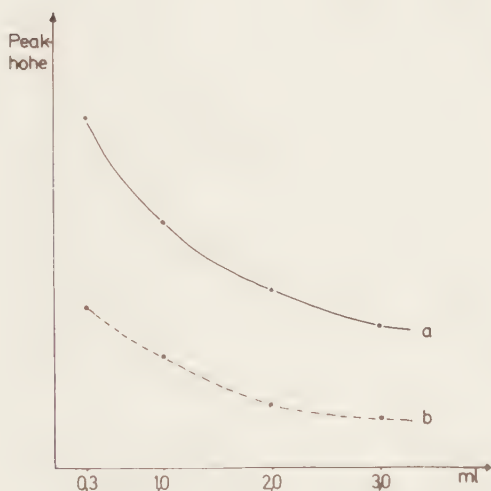


Abb. 24: Verteilung von Heptaminol gegen steigende Mengen von 2,5 N NaOH

———— Chloroform, - - - - - Chloroform/Äther (1:1)

Es wurden dabei jeweils 1 mg Heptaminol (in 0,2 ml H₂O) und 0,1 ml organische Phase eingesetzt. Nach Verteilung durch 2minütiges Vibrieren wurde wie oben nach dem Zentrifugieren 1 μ l organische Phase in das gleiche GC-System gespritzt und die Signale bei der Empfindlichkeit 10⁻¹¹ amps/mV und der Abschwächung 256 registriert. Bei beiden Kurven aus den Mittelwerten ist deutlich zu sehen, daß bei der Verringerung der wässrigen Phase die Extraktionsrate überproportional ansteigt.

Verteilt man jeweils 200 μl einer wässrigen Heptaminollösung mit definier-tem steigendem Gehalt der Base gegen 0,1 ml Chloroform bzw. Extraktionsgemisch (Chloroform/Äther) unter Einsatz von 0,3 ml 2,5 N NaOH als Alkalisierungsmittel, so ergibt sich der in Abb. 25 dargestellte - wie bei allen durch Verteilung erstellten Eichkurven zu den quantitativen Versuchen für die einzelnen Substanzen - linear mit dem theoretischen Gehalt ansteigende Verlauf der Peakhöhen.

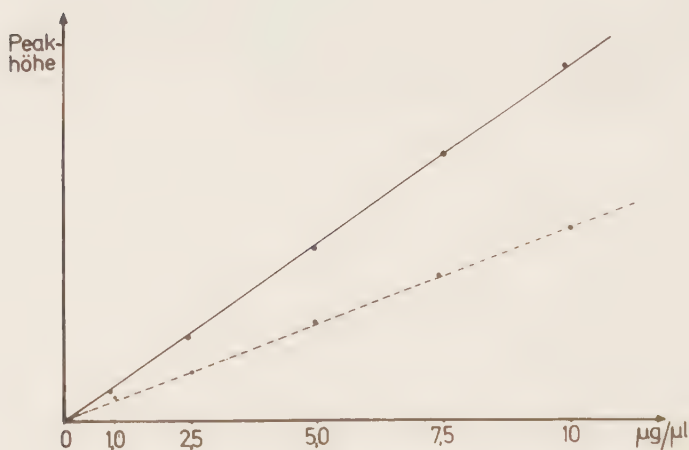


Abb. 25: Verteilung steigender Mengen Heptaminol gegen 0,3 ml NaOH 2,5 N

———— Chloroform, - - - - - Äther/Chloroform (1:1)

Es zeigt sich bei den gewählten Volumina ein Extraktionsverhältnis Äther-Chloroform-Gemisch/Chloroform von ca. 0,6 : 1,0.

Für die Untersuchung der Verluste bei den einzelnen Teilschritten ist die Kenntnis der absoluten Größen unnötig, da der jeweils analog aufgearbeitete Vergleich die Beurteilung der relativen Wirksamkeit der Manipulation zuläßt.

Bezieht man die Extraktionsraten auf die oben erwähnte Stammlösung aus dem gravimetrischen Versuch mit einem Gehalt von 5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ freie Base, so ergibt sich für die Verteilung von 1 mg Heptaminol in 0,3 ml NaOH 2,5 N gegen 100 μl Chloroform, wie oben durchgeführt, eine Umsetzung von 65 %.

Bei der Verteilung im Schmelzpunktröhrchen (5 μ l Chloroform/Äther, 10 μ l NaOH 2,5 N, 10 μ l Na₂SO₃ 10 %, 10 μ l Heptaminollösung = 50 μ g) lassen sich gaschromatographisch nur 25 % der eingesetzten Menge erfassen.

Schließlich wurde bei Einsatz von 75 μ g Heptaminolbase bei 15 ml Harn nach 3.4.1. der Gesamtanalysengang durchgeführt. Die mit β -Naphthochinonsulfonsäure erhaltene Färbung hob sich deutlich (auch ohne die von BÄUMLER u. Mit. 10 empfohlene Behandlung mit Essigsäure) vom schwach rötlichen Leerwert bzw. Untergrund ab. Nach der DC-, GC-Aufarbeitung wurde bei einer Empfindlichkeit 10⁻¹¹, Abschwächung 8 (übige Parameter s.o.) ein Ausschlag von ungefähr 10 % des 2 mV-Schreibers erzielt. Bezogen auf eine Vergleichsverteilung entspricht das einer Ausbeute von 2 % der eingesetzten Menge. Diese ungünstigen Werte erscheinen auf den ersten Blick völlig ungenügend. Zieht man aber die Mitteilung über die Versuchsergebnisse der Firma DELALANDE (46) zum Vergleich heran, so werden dort nach Einnahme einer therapeutischen Einheit (1 Dragee = 300 mg) im Harn der ersten 12 Stunden nach Verabfolgung, Konzentrationen von 25-38 mg % (entspricht 250-380 ppm) gemessen. RABIAN T u. Mit. (114) bestätigen, daß bei Einnahme von 300-600 mg Dosen in den ersten 24 Stunden 75-94 % der zugeführten Menge unverändert zur Ausscheidung gelangen. Der Harn der ersten 3-4 Stunden enthält bereits ca. 50 % der zugeführten Dosis. Durch Kernresonanz- und gekoppelte Massenspektrometrie konnten die Autoren die Identität der gefundenen Substanz sichern. Bei der beschriebenen gezielten Aufarbeitung können noch Konzentrationen von 1 μ g/ml bei 50 ml Harneinsatz erfaßt werden. Der Substanzbedarf liegt hier bei 50 μ g, während für das erarbeitete allgemeine Trennschema 75 μ g benötigt werden.

Legt man die Ergebnisse der beiden genannten Arbeiten zugrunde, so liegen die zu erwartenden Konzentrationen im Sammelharn der ersten 12 Stunden nach einer therapeutischen Einheit und bis 24 Stunden nach der doppelten Dosis (600 mg) um den Faktor 50-60 über der untersuchten Konzentration von 5 ppm. So wird auch bei dieser schlechten Gesamtausbeute das Verfahren den Anforderungen der Praxis gerecht, zumal bei der Gaschromatographie die Empfindlichkeit des Flammenionisationsdetektors nicht voll ausgenutzt wurde.

Die quantitative Untersuchung der Teilschritte am Beispiel des Heptaminols zeigte, daß bei ungünstigen Extraktionsraten höhere Ausgangskonzentrationen oder größere Probenmengen erforderlich sind. Chloroform könnte zwar die Ausbeuten steigern, würde aber die unter 3.4.1. beschriebenen Nachteile, wie z.B. der Gruppenverschiebung einer Reihe von Substanzen und durch die höhere Extraktionskapazität mehr Verunreinigungen im Extrakt, mit sich bringen. Wie Abbildung 22 zeigt, können bei relativ gut wasserlöslichen Substanzen bei steigenden Konzentrationen von Natriumkarbonat die Extraktionsraten beträchtlich erhöht werden. In der Arbeitsvorschrift für die Extraktion (3.5.1.) wird diesem Befund Rechnung getragen.

3.4.3.2. Verbindungen mit extrem niedriger DC-Erfassungsgrenze

Auch nach Anwendung der in 3.4.2. erarbeiteten Verbesserung der Anreicherung und Transfertechnik auf die DC-Platten ergaben sich zunächst für Spartein bei den Additionsversuchen unbefriedigende Ergebnisse. Es zeigte sich, daß das unter 3.4. allgemein verwendete Fließmittel 12 mit dem niedrigen Rf-Wert für Spartein ungünstig war. In den gelagerten Leerharnen traten häufig in gleicher Höhe scharf begrenzte, mit Dragendorff-Reagenz unter Bildung dunkler Farben reagierende Zonen auf. Eine DC-Auswertung, die als Postulat den unempfindlichsten Schritt der Kette darstellte, war somit nicht möglich. Durch Einsatz des Fließmittels 24a konnte diese Störung umgangen werden. Es zeigte sich jedoch bei dieser Substanz, daß noch $0,1 \mu\text{g}$ Base mit dem variierten Reagenz nach DRAGENDORFF eine positive Reaktion geben, während $0,25 \mu\text{g}$ (theoretischer Einsatz) nach vorausgegangener Verteilung bei einer Elektrometereinstellung 10^{-11} , Abschwächung 1/16 nur noch einen Schreiberausschlag von ca. 8 % der Gesamtbreite bringen. Am verwendeten Gerät wäre also bei dem vorgeschlagenen Verfahrensschritt bei einem fraglichen positiven Sparteinbefund die maximale Empfindlichkeit des GC-Systems einzusetzen, um der Empfindlichkeit der Dünnschichtchromatographie gerecht zu werden. Bei Einsatz eines N-spezifischen Detektors, der die volle Ausnutzung der elektronischen Verstärkungsmöglichkeit auch in der Nähe des Lösungsmittelpeaks zuläßt, könnte dies wahrscheinlich umgangen werden. Während bei den Amphetaminen die relative Flüchtigkeit den Nachweis erschwert, scheint bei Spartein rasch bei Luftzutritt Zersetzung einzutreten.

Aus dem Sulfat konnten bei Einsatz von 0,5 g gravimetrisch - nach dem Alkalisieren und dreimaligem Extrahieren mit Äther (peroxidfrei) - bezogen auf den Gehalt an freier Base, 85 % einer schwach bräunlichen, zähen Flüssigkeit bestimmt werden. Beim anschließenden Trocknen bei ca. 30 Torr und 80°C über Nacht, trat nur ein Gewichtsverlust von 1 % ein. Mit Methanol zu 1 mg/ml in Lösung gebracht, ließen sich gaschromatographisch nur 65 % der Peakhöhe einer analogen, durch einmaliges Umsetzen gewonnenen Lösung mit theoretisch gleichem Gehalt erzielen. Da die Eichkurve linear verläuft, würde dies einer Ausbeute von maximal 55 % an Wirksubstanz im gravimetrisch kontrollierten Extrakt gleichkommen. Die braune Farbe der methanolischen Lösung der Base intensiviert sich beim Stehen am Licht innerhalb weniger Tage.

Nach den Isolierungsversuchen unter 3.1.1. steht bei einem Einsatz von $0,4 \text{ mg}/100 \text{ ml}$ Wasser nach Säurezusatz eine Ausbeute von 65-80 % einer Rückgewinnung von 10-20 % ohne Säurezusatz gegenüber.

Aus $5 \mu\text{g}$ Base als Salz ließen sich nach DC-Passage einschließlich Detektion 50-60 % gaschromatographisch bestimmen. Bei stufenweiser Besprühung (1-6 nach 3.2.1.5.) lagen lediglich die Werte aus den unbesprühten Zonen etwas höher, während die Ergebnisse aus der Sprühreihe nicht zu unterscheiden waren.

Bei den Additionsversuchen nach 3.4. konnten bei Einsatz von $7,5 \mu\text{g}/15 \text{ ml}$ Harn (= 0,5 ppm) nach Durchlauf des Analysenschemas unter Verwendung

des Fließmittels 24a bei der DC 35 % der Ausgangsmenge gaschromatographisch nachgewiesen werden. Bei der Empfindlichkeitseinstellung 10^{-11} , Abschwächung 1/32 beträgt dabei die Detektorantwort ca. 30 % des Gesamtausschlages des 2 mV-Schreibers.

3.4.3.3. Säurelabile Verbindungen

Bei Einsatz von 4, 5 und 6 μg Orphenadrinbase pro 15 ml Harn, brachte die Aufarbeitung nach dem Trennschema, unter Berücksichtigung der Verbesserung der Einzelschritte, bei der Detektion auf der DC-Platte (Fließmittel 12) gut erkennbare Flecken. Die anschließende GC-Prüfung bei 180° auf der Carbowax 20 M/KOH Säule (Parameter s. Tab. 2) verlief jedoch unbefriedigend. Das erzielte Signal mit der Retentionszeit des Orphenadrins stellte sich nur angedeutet als Schulter dar.

Da bei der Struktur des Orphenadrins eine Zersetzung mit Säure durchaus denkbar war, wurde bei der Wiederholung der Versuchsreihe ein Teil der Werte nach dem Sprühen mit Dragendorff-Reagenz getrocknet und aufgearbeitet, während der Rest nach dem Besprühen mit Säure und Jod weiter behandelt wurde. Da die Schicht vor dem Überführen in die Schmelzpunktröhren trocken sein muß, wurde jeweils mit Warmluft geblasen. Es wurde dabei das Ergebnis hinsichtlich der sauer behandelten Werte bestätigt, dagegen zeigten die restlichen Werte gute Peaks, deren Retentionszeit mit der der Reinsubstanz übereinstimmte.

Durch einen Versuch nur über DC-GC, wurde bei 10 μg Einsatz die Ausbeutenminderung durch den Säurespray (3.2.1.5.) untersucht. In den mineralsauer besprühten Ansätzen, deren mittlere Wiederfindungsrate bei 25 % lag, traten Nebenpeaks niedriger und höherer Retentionszeit als Orphenadrin auf. Diese Signale fehlten, wenn nach der Reaktion mit Dragendorff-Reagenz die gaschromatographische Untersuchung angeschlossen wurde. Der Mittelwert der Ausbeute lag hier bei 65 %.

Wenn nun bei der Aufarbeitung DC-GC das mineralsäuerere Medium die Ausbeute drastisch senken konnte, schien der zur Erhöhung der Ausbeute flüchtiger Basen verwendete Zusatz von Salzsäure beim Einengen des Ätherextraktes fragwürdig. Obwohl bei den ersten Versuchsreihen mit 4, 5 und 6 $\mu\text{g}/15$ ml Harn deutlich positive Befunde erzielt wurden, sollte am Beispiel Orphenadrin für säurelabile Substanzen geklärt werden, welchen Einfluß wechselnde Mengen Säure auf die Ausbeute bei der erarbeiteten Methode haben.

Um dies zu klären, wurde eine Lösung von 0,8 mg der Base als Hydrochlorid in 200 ml Wasser nach dem Alkalisieren mit peroxidfreiem Äther extrahiert (3.1.1.). Anteile der vereinten Extrakte wurden mit steigenden Mengen (0,2; 0,5; 1,0 und 3,0 ml) der Mischung Methanol/Salzsäure (99:1) versetzt, in Spitzgläsern bei 50° im Wasserbad eingengt (3.5.1.). Anteile ohne Säurezusatz wurden als Vergleich mitgeführt. Während bei 0,2 und 0,5 ml die Werte denen ohne Säurezusatz entsprachen, waren bei 1 ml und 3 ml Zusatz nur maximal 5 % zurückzugewinnen.

Neben der Menge an Säure scheint auch von Bedeutung zu sein, ob die zutropfende Flüssigkeitsmenge sofort verdampft - die Spitze des Zentrifugenrohres also praktisch trocken bleibt - oder ständig Extraktionsflüssigkeit einem siedenden Reservoir zufließt, die Substanz also ständig gelöst bleibt⁺⁾ .

Nach diesem Ergebnis scheint das von UHLMANN (132) bei der Untersuchung von pharmazeutischen Präparaten auf basische Suchtmittel vorgeschlagene Einengen von 20 ml 0,1 N HCl nach der Reextraktion für einen allgemeinen Analysengang völlig unbrauchbar. Das von HEYNDRIX u. DE LEENHEER (74) bei einem der Reinigungsschritte beim Dopingnachweis eingeschaltete Einengen nach Zusatz von 0,1 ml konzentrierter Salzsäure verändert labile Stoffe vor dem Nachweis ebenfalls. Unter diesem Aspekt sind Zusätze verdünnter Schwefelsäure und Einengen bis zur Trockene nur sinnvoll, wenn jeder Überschuß vermieden wird; flüchtige Basen werden dann jedoch nur zum Teil zurückgehalten.

Am Beispiel des Pseudoephedrins und des Dimethylamphetamins war bei der Prüfung des Säurezusatzes bei der Einengung keine Beeinträchtigung der Ausbeute durch steigende Mengen (bis 5,0 ml) zu beobachten. Für Pseudoephedrin ergaben sich im 100 µg Bereich nach Zusatz von 1 bzw. 5 ml methanolischer HCl 80 % Ausbeute.

Unter Beachtung der erhaltenen Befunde konnte bei Einsatz von 4,5 µg Orphenadrin pro 15 ml Harn am Ende noch 10 % der eingesetzten Menge gaschromatographisch bestimmt werden. Die dabei erzielten Peaks reichen bei der Einstellung 10^{-11} , Abschwächung 1/8 noch über 15 % des 2mV-Schreibers.

Auch bei diesen Substanzen, für die der Analysengang nach 3.4.1. nicht optimal ist, zeigte sich ein Vorteil der vorgeschlagenen Methode. Ein längerer Zeit gelagerter Extrakt der Base erbrachte im gleichen GC-System mehrere Peaks gleicher Größenordnung, während bei einem analog gelagerten salzsaureren Extrakt, wie erwartet, die Zersetzungsprodukte weitaus geringer waren. Die Substanz war dabei noch deutlich als Hauptpeak erhalten. Dies ermöglicht z. B. Extrakte auch nach längerer Lagerzeit zu Vergleichszwecken zu verwenden.

3.4.4. Wirksamkeit des Gesamtanalysenganges

Nachdem die unter 3.4.2. und 3.4.3. beschriebenen Schwierigkeiten geklärt waren, wurden nach der vorgeschlagenen Methodik die Ausbeuteverhältnisse über den gesamten Trennungsgang für weitere 14 Substanzen, die in unveränderter Form im Harn auftreten (u. a. 12, 13, 14, 17, 18, 37, 46, 53, 61, 87, 114, 143), bestimmt. Dabei sollte nicht die Erfassungsgrenze ermittelt, sondern praxisbezogen an gut erfassbaren Mengen die Wirksamkeit des Analysenganges geprüft werden. Neben den, als typische Dopingmittel geltenden Substanzen aus der Amphetamin- und Ephedrinreihe, waren das Kreislaufmittel Coramin sowie die Herzmittel Heptaminol und Spartein herangezogen worden.

+) Dies kann leicht eintreten, wenn die Tropftrichter noch Reste von Wasser oder Methanol vom Spülen enthalten.

Bei der Übersichtsbestimmung wurde aus folgenden Gründen auf Einsatz eines inneren Standards verzichtet:

- a) Der Zusatz eines Standards zur Ausgangsprobe könnte Unsicherheiten bei der Aufarbeitung DC-GC nicht beseitigen. (Die DC-Zone des Standards müßte unter gleichen Fehlermöglichkeiten aufgearbeitet werden).
- b) Die Fehlermöglichkeiten sind bei der gesamten Aufarbeitung erheblich größer als bei der abschließenden Dosierung. Bei Einsatz des Standards könnte bei der Überführung DC-GC jedoch nur die Dosierung zur GC korrigiert werden.
- c) Da isotherm bei verschiedenen Temperaturen gearbeitet wurde, wäre jeweils eine neue Standardsubstanz nötig.

Um den Fehleranteil durch die Dosierung ohne Standard beurteilen zu können, wurde in Vorversuchen die Reproduzierbarkeit mit einer Coffeinelösung in Chloroform (1 mg/ml) bei Einsatz von 1,3 µl auf der Säule Carbowax 20M/KOH bei 200°C^{*)} mit einer Hamilton-Spritze ohne besondere Dosiervorrichtung geprüft. Es ergab sich eine Streuung der erzielten Peakhöhen von $\pm 2,5\%$. Es wurde dabei jeweils die Analysenlösung luftblasenfrei in der Spritze dosiert. Steht wie bei der durchgeführten Aufarbeitung nur eine kleine Menge an Analysenlösung zur Verfügung, ist diese Dosierungsart nicht immer durchführbar. Es wird deshalb mit der trockenen Spritze einmal aufgezogen und die Einspritzmenge vor der durch das Totvolumen entstehenden Luftblase dosiert. Dies bringt naturgemäß eine größere Ungenauigkeit mit sich. Mit der obigen Coffeinelösung ergibt sich bei 10 Einspritzungen ein σ von $\pm 8\%$.

Betrachtet man jedoch - da stets der Mittelwert der verschiedenen Parallelansätze zur Berechnung verwendet wurde - die mittleren absoluten Fehler der Mittelwerte nach GAUSS, so steht einem Wert von $\pm 0,7\%$ nach der ersten Variante einem Δx von $\pm 3,3\%$ nach der zweiten Methode gegenüber. Bei der Verdünnung der oben verwendeten Coffeinelösung mit 1 µg/µl im Verhältnis 1:25 mit CCl₄ erbrachte eine Injektionsmenge von 1 µl (entspricht 0,04 µg) am 2mV Schreiber noch einen Peak von ca. 10 % des Gesamtaus-schlages (Empfindlichkeitsbereich 10⁻¹² amps/mV, Abschwächung 1/2). Dieser Peak sitzt jedoch dem des Lösungsmittels auf.

Bei einer Verdünnung mit Chloroform konnte wegen des starken Lösungsmittelsignales die elektronische Verstärkung nur bis 10⁻¹¹ amps/mV bei einer Abschwächung von 1/1 ausgenutzt werden. Bei einer Verdünnung 1:10 konnte bei 1 µl Einspritzmenge (entspricht 0,1 µg) ein Peak gleicher Größenordnung erzielt werden. Bei höherer Konzentration und geringerem Volumen wären auch bei Einsatz von Chloroform noch kleinere Mengen nachzuweisen.

Da diese Versuche zwar zeigten, daß bei dieser Methode der Aufarbeitung die Nachweisgrenze durch die Gaschromatographie auch bei den hier vorliegenden ungünstigen Verhältnissen Lösungsmittelpik/Wirksubstanz unter den in der Praxis zu erwartenden Konzentrationen und unter der beim DC-Screening erfaßten Menge liegt, sollte, da die verwendete Säule besonders für die Trennung der Ephedrin-Reihe geeignet ist, am Beispiel des Methylephedrins die Grenzkonzentration bei Injektion von 1 µl Chloroformlösung bestimmt werden.

*) übrige Parameter wie Tab. 2

Dazu wurde wie folgt verfahren:

0,1 ml einer wässrigen Lösung mit 0,1 mg Methylephedrinbase als Hydrochlorid wurde zu 1 ml NaOH 10%ig und 1 ml Chloroform in ein Zentrifugenglas pipettiert und durch Vibrieren während zweimal einer Minute verteilt. Nach dem Zentrifugieren wurden durch Verdünnen mit Chloroform, Lösungen mit einem theoretischen Gehalt von 50, 10 und 5 ng pro μl hergestellt und bei 145°C Säulentemperatur je 1 μl eingespritzt (Varian 1740, Carbowax 20M/KOH, Standardbedingungen Tab. 2).

Trotz günstiger Verteilung liegt der tatsächliche Gehalt der Lösungen noch etwas niedriger. Es wurde in fallender Konzentrationsreihe untersucht; zwischen den Proben wurde mit der gereinigten Spritze bei der jeweils gewählten neuen, höheren Empfindlichkeitsstufe reines Lösungsmittel zur Kontrolle aufgegeben.

Es zeigte sich auch hier, wie durch die steigende Verstärkung der Substanz-peak scheinbar auf das Lösungsmittel wandert. Bei einem Bereich von 10^{-12} amps/mV und einer Abschwächung 1/2 wurde mit 5 ng noch ein Peak von ca. 10 % des 2mV-Ausschlages erzielt. Die Peakhöhe ließ sich dabei zwar reproduzieren, lag jedoch nicht im Linearitätsbereich der aus den stärkeren Lösungen erzielten Peaks.

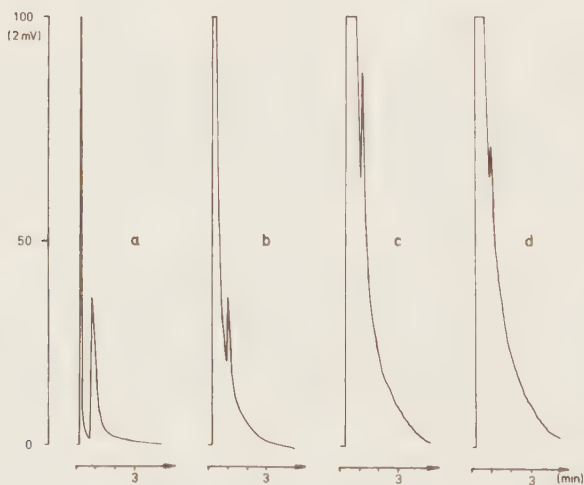


Abb. 26: Bestimmung der GC-Erfassungsgrenze an Methylephedrin

Jeweils 1 μl Chloroform:

a - 1	$\mu\text{g}/\mu\text{l}$	Elektrometereinst.	10^{-11}	amps/mV, Abschwächung	1/16
b = 0,05	$\mu\text{g}/\mu\text{l}$	"	10^{-12}	"	1/16
c = 0,01	$\mu\text{g}/\mu\text{l}$	"	10^{-12}	"	1/2
d = 0,005	$\mu\text{g}/\mu\text{l}$	"	10^{-12}	"	1/2

Es muß jedoch erwähnt werden, daß im Bereich der ermittelten Grenzkonzentrationen ein Unsicherheitsfaktor hinzukommt; da die Breite der Lösungsmittelpeaks stark von der Injektionsart und dem getroffenen Injektionsort im Probeneinlaßteil hinsichtlich seiner Strömungsverhältnisse abhängt und der aufsitzende Peak unter Umständen vom Schreiber abgeschnitten wird.

Bei der Bestimmung der Wirksamkeit des Verfahrens für die Substanzen der B·HCl-Fraktion, wurden nun in je 2-3 Arbeitsansätzen jeweils 4-6 Einzelproben von je 15 ml Harn mit definiertem Zusatz der Substanzen zu gelagertem Harn nach den Arbeitsvorschriften (3.5.) bis zur abschließenden gaschromatographischen Prüfung analysiert. Die Mittelwerte der erzielten Peakhöhen dienten als Meßgröße. Sie wurden auf die bei der Verteilung der eingesetzten Gesamtmenge im Schmelzpunktrohr ohne Kieselgelzusatz erzielten Werte bezogen. Bei der Verteilung von Teilmengen wurde die Linearität der Beziehung bestätigt. Entsprechende Zonen des Leerharnes wurden stets parallel aufgearbeitet, um Fehler durch bereits im Leerharn enthaltene Stoffe auszuschließen.

Die erzielten Mittelwerte der in größerem zeitlichem Abstand durchgeführten Serien sind in Tabelle 10 aufgeführt. Die Werte in Klammer geben die Mindestausbeute jeder Serie an. Große Abweichungen vom Mittelwert wurden in erster Linie auf Störungen der Mikroverteilung nach der DC zurückgeführt. Jedoch ist auch bei den Mindestwerten der Ausbeute ein sicherer positiver Befund gewährleistet.

Es zeigt sich, daß die Unterschiede der einzelnen Reihen erheblich sein können. Insbesondere ergaben sich bei den ersten in der Tabelle 10 aufgeführten Stoffen größere Unterschiede. Bei der Wiederholung der Serien hat der Übungszuwachs bei der etwas diffizilen Prozedur sowie die Anpassung an die Anforderungen der Praxis (gesamte Aufarbeitung während eines Arbeitsganges an einem Tag) zu einer Ausbeutenerhöhung geführt. Dies zeigte sich bereits in Vorversuchen.

Tab. 10: Wiederfindungsraten aus Harn nach dem Gesamtgang

Substanz	Einsatz μg Base in 15 ml Harn	= ppm	Mittel- (Mindest-)wert %	Säulen- temp. ¹ $^{\circ}\text{C}$	Einstellg. am 1740 ²
Äthylamphetamin	3	0,2	21 (17); 44 (29)	80	11/16
Äthylephedrin (Etafedrin)	4,5	0,3	22 (12); 34 (32)	135	11/32
Amphetamin	3	0,2	15 (7); 27 (19)	80	11/16
Cyclopentamin	3	0,2	50 (32); 42 (23)	65	11/32
Dimethylamphet.	3	0,2	23 (18); 52 (49)	80	11/16
Fencamfamin	4,5	0,3	40 (28); 37 (35)	140	11/16
Heptaminol	75	5,0	1-2 siehe 3.4.3.1.	155	11/8
Methamphetamin	3	0,2	23 (8); 25 (18)	80	11/16
Methylephedrin	3	0,2	36 (21)	130	11/8
	4,5	0,3	44 (33)	130	11/32
Nikethamid ^{3,4}	4,5	0,3	43 (22); 31 (24)	145	11/16
Orphenadrin	4,5	0,3	10 siehe 3.4.3.3.	180	11/8
Phenmetrazin	4,5	0,3	45 (38)	135	11/32
	3	0,2	57 (33)	135	11/16
Phentermin ³	4,5	0,3	36 (29); 35 (24)	80	11/32
Prolintan	4,5	0,3	34 (20); 32 (22)	125	11/32
Propylhexedrin	3	0,2	55 (32); 56 (28)	85	11/64
Pseudoephedrin	6	0,4	25 (6); 23 (7)	140	11/32
Sparteine	7,5	0,5	35 siehe 3.4.3.2.	140	11/32

- 1 Die Temperatur der Säule - 2 % Carbowax 20M, 5 % KOH auf Chromo-sorb G AW-DMCS (17) - wurde so gewählt, daß die untersuchte Substanz im Bereich 0,7-3 Minuten nach der Lösungsmittelfront erschien. Neben einer hohen Analysenfrequenz erlauben die erzielten scharfen Peaks eine lineare Auswertung über die Peakhöhe.

GC-Gerät: Modell 1740 Varian; Säule: 3 Fuß, 2 mm Innendurchmesser, Stahl; Temp.: Injektor 200°C, Detektor (FID) 225°C; Gasfluß: N₂ = 25, Luft = 250, H₂ = 25 ml/Min.

- 2 Verstärkung ($\text{amps} \cdot \text{mV}^{-1}$) / Abschwächungsfaktor
- 3 Es wurde die Reaktion mit Jod nach dem Besprühen mit Schwefelsäure (Nr. 6) zur Auffindung der Substanzzonen benutzt, während für die übrigen Beispiele die Detektionsschritte 3, 4 oder 5 (nach 3.2.1.5.) herangezogen wurden. Als Fließmittel wurden die Mischungen 12 und 24a eingesetzt.
- 4 Die Substanz fällt bei der durchgeführten Analysenmethode im basischen Extrakt an, während sie nach WINTERFELD (146) im saueren Extraktanteil gefunden wird.

Tab. 11: Formelbilder der in Tab. 10 aufgeführten Substanzen

	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	
	H	H	H	H	Amphetamin
	H	CH ₃	H	H	Methamphetamin
	H	C ₂ H ₅	H	H	Äthylamphetamin
	H	CH ₃	CH ₃	H	Dimethylamphetamin
	H	H	H	CH ₃	Phentermin
	OH	CH ₃	H	H	Pseudoephedrin
	OH	CH ₃	CH ₃	H	Methylephedrin
	OH	C ₂ H ₅	CH ₃	H	Äthylephedrin

$R_5-CH_2-\underset{\substack{ \\ N \\ \\ H \quad CH_3}}{CH}-CH_3$	$R_5 = $	Propylhexedrin
	$R_5 = $	Cyclopentamin

Fencamfamin	Phenmetrazin	Nikethamid

	$CH_3-\underset{\substack{ \\ NH_2}}{CH}-CH_2-CH_2-CH_2-\underset{\substack{ \\ OH}}{\overset{\substack{ \\ CH_3}}{C}}-CH_3$
Prolintan	Heptaminol

Orphenadrin	Sparteine

Die Ausbeuteversuche waren zur Kontrolle der Wirksamkeit des Analysenschemas durchgeführt worden, sie waren nicht als quantitative Bestimmungsmethode vorgesehen. Sie erlauben allenfalls halbquantitative Aussagen. Auf eine statistische Auswertung, bei der die extrem niedrigen Werte nach einem Test auf Ausreißer eliminiert werden dürften, wurde deshalb verzichtet.

Bei der Untersuchung auf Dopingmittel genügt es, die betreffende Substanz qualitativ nachzuweisen (52); die Ausscheidungskonzentrationen lassen wenig Aussage über die Einnahmemenge zu.

Soll dennoch eine quantitative Bestimmung der flüchtigen Basen durchgeführt werden, genügt es, 1-5 ml der Probe zurückzubehalten. Nach einer Einmalverteilung, z.B. mit 10-20 μ l Chloroform pro ml Harn bei Einsatz eines inneren Standards läßt sich der vorher bereits qualitativ gesicherte Stoff aus der alkalisierten Probe gaschromatographisch bestimmen. Dies wurde z.B. von RAMSEY u. CAMPBELL (115) beschrieben.

Die gefundenen Grenzkonzentrationen bei der GC-Bestimmung lassen unter Berücksichtigung der ermittelten Wiederfindungsraten - ohne weiteren technischen Aufwand, wie z.B. spezielle Detektoren - den Nachweis geringerer Mengen an Wirksubstanz zu. Die Angaben der Elektrometereinstellung zeigen, daß die Verstärkungsmöglichkeit bei weitem noch nicht ausgeschöpft wurde (maximale Verstärkung 10^{-12} amps/mV, Abschwächung 1).

Dies ist bei Vorliegen kleiner Problemengen oder bei Proben, die längere Zeit nach der fraglichen Einnahme gewonnen werden, ebenso von Bedeutung wie bei gezielter Frage nach der Anwesenheit eines bestimmten Stoffes, z.B. in geringen Mengen einer Blutprobe nach der Alkoholbestimmung. Als DC-Detektion eignet sich dann besonders die empfindliche Reaktion mit Jod nach dem Besprühen mit Schwefelsäure.

3.5. Arbeitsvorschriften

3.5.1. Anreicherung und Gruppentrennung aus Harn

Für Dopinganalysen sollte bereits bei der Probenentnahme wegen der pH-abhängigen Varianz der Ausscheidungsraten der pH gemessen werden. Es empfiehlt sich, gegebenenfalls anzusäuern.

Extraktion aus sauerem Milieu (SÄ):

10-100 ml der Harnprobe⁺) werden mit H_2SO_4 (10%) auf pH 1-2 gebracht (Indikatorpapier oder Glaselektrode). Es wird dreimal mit dem gleichen Volumen Diäthyläther⁺⁺) in einem Scheidetrichter mit Teflonküken extrahiert. Dazu werden die Phasen jeweils 5 Minuten mit einer mechanischen Schüttelmaschine⁺⁺⁺) oder dreimal 3 Minuten von Hand durchmischt.

Die vereinigten Ätherextrakte werden mit 5-10 ml H_2O gewaschen. Auf eine Trocknung über Natriumsulfat, die nach STONE u. HENWOOD (128) für Barbiturate Verluste von 20-40 % bringen kann, wird verzichtet.

Der Ätherextrakt wird in Abdampfschalen (Durchmesser 40 mm) auf dem Sandbad bei 40° zum Extrakt SÄ eingengt.

Getränkereste werden analog behandelt, während Tablettenrückstände zuvor in wenig Wasser suspendiert werden.

+) Bei mehr als 30 ml Probe werden 5-10 ml für eine quantitative Bestimmung zurückbehalten.

++) Es wird stets peroxidfreier Äther nach HESSE u. Mit. (73) eingesetzt.

+++) Es wurde dazu die Universalschüttelmaschine Modell B der Firma Bühler, Tübingen, verwendet.

Extraktion aus alkalischem Milieu (B·HCl):

Die nach der saueren Extraktion verbleibende wässrige Phase wird mit 5 g festem, wasserfreiem Natriumkarbonat pro 15 ml Harn versetzt und erneut dreimal mit der gleichen Menge Äther extrahiert. Verteilung 5 Minuten mit der Schüttelmaschine oder dreimal 3 Minuten von Hand.

Die vereinigten Ätherauszüge werden ungetrocknet tropfenweise mit 0,12 N methanolischer Salzsäure versetzt, bis eine Probe nach dem Durchmischen auf Indikatorpapier sauer reagiert. Unter dem Abzug werden in ein thermostatisiertes Wasserbad von 50-55°C⁺) mit 45° Neigung sehr spitz ausgezogene Reagenzgläser mit Normalschliff (Inhalt ca. 8 ml) eingehängt⁺⁺). Nach dem Temperatúrausgleich (ca. 5 Min.) läßt man aus einem darüber montierten Tropftrichter mit Flachscliffhahn (Abb. 21) mit engem Abtropfrohr eben soviel Extrakt zufließen, daß am Boden des Spitzglases keine Flüssigkeitsansammlung zustande kommt. Die Spitze des Tropftrichters wird an die Innenwandung des Glases zur Vergrößerung der Oberfläche angelegt. Bei einer Tropfzeit von ca. 80 Minuten pro 100 ml Äther verbleibt der trockene basische Extrakt (B·HCl)⁺⁺⁺).

Wurde die Extraktionsflüssigkeit beim Einengen über die Schliffinnenfläche abgetropft, wird zweimal mit je 0,5 ml Methanol nachgespült. Am Rotavap wird das Methanol bei 50° Badtemperatur durch Übersaugen von Luft abgedunstet (Abb. 20).

+) Glaswannen eignen sich besonders gut, da die Einstellung der Tropfgeschwindigkeit gut beobachtet werden kann.

++) Auch Gläser mit Schraubverschluß (z. B. Firma Sovirel) deren Boden spitz ausgezogen ist, eignen sich.

+++) Zu geringe Tropfgeschwindigkeit führt zu sehr langen Arbeitszeiten, während zu hohe Tropffrequenz meist einen Siedeverzug mit Verlusten bis zur Zerstörung der Probe provoziert.

Extraktion aus sauerem Milieu nach der Hydrolyse (HySÄ)

Die nach der Abtrennung der Gruppe B·HCl verbleibende wässrige Phase wird portionsweise unter Rühren in 20 ml HCl 35 % (pro 15 ml Harn) eingebracht. Es wird 5 Minuten gerührt. Nach weiteren 5 Minuten wird vom ausgefallenen NaCl abfiltriert. Der Filtrerrückstand wird mit 10 ml HCl konz. nachgewaschen. Das Filtrat wird in einem Becherglas 10 Minuten am Sieden gehalten⁺). Anschließend wird die Lösung unter Kühlung mit NH₃ (25 %) auf pH 1-2 gebracht. Am besten unter Verwendung einer Glaselektrode. Es wird dreimal mit der gleichen Menge Diäthyläther wie oben verteilt.

Die vereinigten Ätherextrakte werden mit 10 ml H₂SO₄ (0,05N) gewaschen zur Fraktion HySÄ eingeengt.

Extraktion aus alkalischem Milieu nach der Hydrolyse (HyB)

Die nach der Abtrennung der Gruppe HySÄ anfallende saure, wässrige Phase wird mit Ammoniaklösung 25 % alkalisiert (pH 8,5-9,5) und dreimal mit der gleichen Menge Chloroform: Isopropanol (9:1) ausgeschüttelt.

Die organische Phase wird über wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet. Portionsweise wird in einer kleinen Abdampfschale auf dem Wasserbad zum Extrakt HyB eingeengt.

⁺) Nach GELDMACHER-v. MALLINCKRODT u. MANG (63) genügen beim Einsatz azeotroper Salzsäure schon kurze Hydrolysezeiten zur Spaltung von Paarlingen.

3.5.2. Transfer B·HCl-Extrakt - Dünnschichtchromatographie

Nach dem Einengen wird zu dem Extrakt B·HCl im Spitzglas 0,3 ml NaOH 10 % und pro 15 ml Harn 25-30 μ l Chloroform zugefügt. Das mit einem Schliffstopfen mit Teflonmanschette verschlossene Glas wird zweimal 3 Minuten kräftig durch seitliches Anlegen an den Rotor des Mikromixers⁺) vibriert. Die gesamte Innenfläche wird dabei von der intensiv durchmischten Flüssigkeit benetzt. Anschließend wird zur Phasentrennung 3 Minuten bei ca. 500 U/Min. zentrifugiert.

Mit einer Mikroliterspritze mit stumpfer langer Kanüle wird der 15 ml Harn entsprechende Anteil entnommen und auf je einen Startpunkt einer Dünnschichtplatte aufgetragen. Bei geringen Probenmengen (≤ 15 ml) wird nochmals mit 10 μ l Chloroform extrahiert und auf den gleichen Startpunkt aufgetragen.

3.5.3. Transfer Dünnschichtchromatographie - Gaschromatographie

Die nach dem Besprühen mit Dragendorff-Reagenz (3.2.1.5.) erscheinenden Substanzflecken werden nach dem Trocknen auf die gleiche Weise weiterverarbeitet wie nach dem anschließenden Besprühen mit H₂SO₄ und Jod zusätzlich positiv reagierende Zonen.

In dünnwandigen Glasröhrchen von 40-43 mm Länge und einem Innendurchmesser von 1,5 mm wird das trockene abgeschabte Sorbens mit einer gekürzten Pasteurpipette als Trichter eingefüllt⁺⁺). 15 μ l Na₂SO₃ 10 %, 15 μ l 2,5 N NaOH und 5 μ l Extraktionsmischung⁺⁺⁺⁾ Äther/Chloroform (1+1 V/V) werden mit der Mikrospritze zugegeben.

Anschließend wird ca. 10 Sekunden mit der Spinco 152 zentrifugiert⁺⁺⁺⁺⁾; die Schmelzpunktröhrchen werden dazu in einen Zentrifugenbecher aus Polypropylen ohne Verschluss geschoben. Das offene Ende der Glasröhre steht dabei so weit über den als Auflage dienenden Wulst hinaus, daß sie gut faßbar ist, ohne das Einschieben der Halteplatte in den Rotorkopf zu behindern. Mit einem Gebläse wird bei gebündelter, kleiner Flamme das offene Ende der Glasröhre verschmolzen.

+) Modell 154B, Firma Beckman, München

++) Feuchtes Schichtmaterial und zu starkes Besprühen mit Schwefelsäure (Detektionsschritt Nr. 5) führen leicht zur Verlegung der Einfüllkapillare.

+++) Bei starker Farbreaktion bei der Detektion bis 20 μ l.

++++) An der Mikrozentrifuge wurde der Zeitvorwahlschalter durch einen Druckknopfkontakt ersetzt.

Nach dem Abkühlen wird im Zentrifugenröhrchen zehnmal kurz (ca. 5 Sek.) zentrifugiert, wobei jedesmal das Probenröhrchen um 180° gedreht wird. Es ist darauf zu achten, daß das gesamte Sorbens jeweils den Bodenkörper bildet, damit die Phasen sich im Gegenstrom durchdringen. Längeres Zentrifugieren fördert das Festbacken der Sedimentschicht; es muß dann durch vorsichtiges seitliches Anlegen an den Rotor des Mikromixers 154B wieder aufgelockert werden. Abschließend wird 1 Minute zentrifugiert, das Röhrchen mit einer Ampullenfeile angeritzt und über der wässrigen Phase abgebrochen.

Mit einer Mikroliterspritze ($10\ \mu\text{l}$)⁺ wird mit einer stumpfen Kanüle die organische Phase abgenommen⁺⁺). Dabei wird beim Eintauchen in den wässrigen Überstand eine Luftblase an der Kanülenöffnung gebildet und so eine Verunreinigung der Kanüle verhindert. Die Probenlösung wird in den Spritzenkörper gezogen, die Nadel außen mit Filterpapier gereinigt; gegebenenfalls in Anteilen auf Spritzen 701 N, aus denen man vorher den Stempel entfernt hat, eingefüllt. Nach Einführen der Stempel werden Aliquote auf die einzelnen Säulen gegeben.

Soll nur für eine GC-Injektion Material entnommen werden, wechselt man nach der Entnahme die stumpfe Kanüle gegen eine mit Spitze aus.

Bei entsprechender Übung kann zur Umgehung des relativ hohen Totvolumens mit jeder zur GC geeigneten Spritze entnommen werden. Es hat sich bei nur $5\ \mu\text{l}$ organischer Phase als günstig erwiesen, wegen der Grenzflächenspannung bei einer Entnahme möglichst viel des Extraktes abzuziehen und wie oben in Anteilen zur GC einzusetzen.

Zeigt die Detektorantwort bei der ersten GC-Analyse hohe Mengen (ca. $5\text{--}10\ \mu\text{g}$) an, wird der verbleibende Extrakt in der Schmelzpunktröhre für weitere Versuche verdünnt.

+) Der Einsatz einer Mikrospritze vom Typ Hamilton 701 RN hat den Vorteil, daß bei unruhiger Kanülenführung aufgenommenes Kieselgel, das leicht zur Verlegung des Lumens führt, leichter wieder entfernt werden kann.

++) Als geeigneter Ständer für die Schmelzpunktröhrchen erwiesen sich mit spitzem Bleistift gelochte Styroporplatten, die zur Erhöhung der Standfestigkeit auf Holz geklebt werden.

4. DISKUSSION DER ERGEBNISSE

Die in der Arbeit entwickelte Methodik wird im Rahmen eines allgemein anwendbaren, universellen toxikologischen Analysenganges der speziellen Fragestellung der Dopinganalyse - dem empfindlichen Nachweis flüchtiger Sympathicomimetika - gerecht.⁺⁾

Die Verwendung der Dünnschichtchromatographie als Screeningverfahren scheint im Vergleich zu den meist eingesetzten gaschromatographischen Methoden einen Verzicht auf Empfindlichkeit zu bedeuten. Es ist dabei jedoch zu bedenken, daß auch bei Nutzung aller Möglichkeiten einer GC-Übersichtsanalyse die zusätzliche dünn-schichtchromatographische Prüfung auf schwerflüchtige Verbindungen unerlässlich ist. Darüber hinaus ist eine störungsfreie GC-Analyse, direkt aus den Extrakten, auch mit einem N-spezifischen Detektor auf frisches Probenmaterial beschränkt.

Die Dünnschichtchromatographie erlaubt auch bei Serienuntersuchungen ohne besonderen apparativen Aufwand eine rasche und umfassende Orientierungsanalyse für alle in der basischen Fraktion anfallenden Wirkstoffe. Die auf die nicht flüchtigen Hydrochloride abgestellte Isolierung erlaubt den Einsatz großer Äthermengen bei geringer Verunreinigung ohne Abdunstungsverluste beim Einengen. Die zusätzlich vorgenommene Reinigung der Extrakte ermöglicht es auch bei altem Probenmaterial hohe Harnäquivalente für die DC einzusetzen. Es wird dadurch die geringere Sensitivität für die flüchtigen Basen größtenteils ausgeglichen.

Während des DC-Screenings werden die Extrakte weiter gereinigt. Die aus definierten Zonen durchgeführte Gaschromatographie gestattet auch bei Anwesenheit mehrerer Substanzen eine exakte Zuordnung der einzelnen Peaks. Störungen durch körpereigene Verbindungen und Fäulnisstoffe werden ausgeschaltet. Aus der Beschränkung der GC auf die positiven Zonen resultiert eine Steigerung des Probendurchsatzes für das einzelne GC-Gerät.

Der systematischen Aufarbeitung des Gesamtmaterials nach einem Trennungsgang wurde gegenüber der häufig praktizierten Methode der Untersuchung von Teilmengen auf jeweils eine analytische Substanzgruppe der Vorzug gegeben. Eine Reduzierung der Wirkstoffmenge bei kleineren Probenmengen wurde dadurch ebenso vermieden wie der Anfall der extrahierbaren Ballaststoffe in jeder Fraktion.

Im Bereich unter 0,5 ppm sind die durchschnittlichen Wiederfindungsraten aus gelagertem Harn für die in Betracht kommenden Substanzen größtenteils gut. Dadurch konnte auf Sprühreagenzien mit engerer Gruppenspezifität zurückgegriffen werden.

Neuere technische Entwicklungen, wie z. B. thermoionische Stickstoffdetektoren oder ein an die GC gekoppeltes Massenspektrometer lassen sich zwanglos in die erarbeitete Methodik einfügen und dadurch möglicherweise Empfindlichkeit und Aussagekraft des Verfahrens weiter steigern.

^{+) Am Institut für Rechtsmedizin der Universität München hat sich das erarbeitete Verfahren bei Dopinguntersuchungen in der Praxis bewährt (G. HAUCK, persönliche Mitteilung)}

5. ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Arbeit wurde der Nachweis von Dopingmitteln nach einem allgemeinen toxikologischen Analysengang erarbeitet. Dabei wurde den an die gezielte Analytik bei der Dopingkontrolle gestellten Forderungen der hohen Empfindlichkeit zur Erfassung von Konzentrationen im Bereich unter 1 ppm für flüchtige Basen und den meist zur Verfügung stehenden Probenmengen von 20 ml und weniger, ebenso Rechnung getragen, wie besonders der für den forensischen Bereich geforderten Sicherheit des Nachweises. Die Anwendbarkeit auf autolytisch verändertes Untersuchungsmaterial wurde durch den Einsatz ungekühlt gelagerten Harnes bestätigt. Die durchgeführte Isolierung und Aufarbeitung der bei der Dopinganalyse besonders interessierenden Gruppe der flüchtigen Sympathicomimetika, deren Nachweis allgemein erhebliche Schwierigkeiten bereitet, beeinträchtigt die bei fraglicher Medikamentbeeinflussung ebenfalls zu prüfenden anderen Gruppen nicht. Gravimetrisch, spektrophotometrisch und gaschromatographisch zeigt sich in Modellversuchen die Wirksamkeit der gewählten Anreicherung über die nicht flüchtigen Hydrochloride. Es fallen dabei leicht zu verarbeitende, trockene Extrakte an. Bei der Infrarotspektrophotometrie erwiesen sich die ausgewählten Substanzbeispiele als stabil.

Ein über eine Einmalverteilung zwischen Natronlauge und Chloroform durchgeführter Reinigungs- und Anreicherungsschritt erlaubt auch bei stark pigmentiertem Probenmaterial konzentrierte Extrakte für die Dünnschichtchromatographie einzusetzen.

Die verwendeten ammoniakhaltigen Fließmittel ermöglichen den Vergleich mit den aufgetragenen Salzen der Vergleichssubstanzen. Aus den bei einer Sprühfolge positiv reagierenden Flecken wird nach einer Mehrphasenverteilung im Mikromaßstab die Gaschromatographie auf geeigneten, in der Literatur beschriebenen Säulen, durchgeführt. Schwierigkeiten bei ungünstiger Verteilung gut wasserlöslicher Verbindungen werden durch Aussalzen bei der Ätherextraktion weitgehend umgangen. Säurelabilen Verbindungen wird bei der Anreicherung und Isolierung ebenso Rechnung getragen wie bei der Aufarbeitung für die Gaschromatographie nach dem DC-Screening.

In Additionsversuchen zeigt sich die Wirksamkeit des Gesamtanalysenganges im Bereich unter 0,5 ppm. Auch bei ungünstigen Ausbeuteverhältnissen ist der Nachweis nach therapeutischer Dosierung möglich.

6. LITERATURVERZEICHNIS

- (1) ALFES, H. u. CLASING, D., Dtsch. Z. ges. gerichtl. Med.
64, 235 (1969).
- (2) ALFES, H., REISCH, J., CLASING, D. u. MÖLLMANN, H.,
Sportarzt Sportmed. 19, 492 (1968).
- (3) ANDERS, M.W. u. MANNERING, G.J., Analytic. Chem.
34, 730 (1962).
- (4) AUTERHOFF, H., Identifizierung von Arzneistoffen, Wissenschaftl.
Verlagsgesellschaft, Stuttgart 1971.
- (5) AWE, W. u. SCHULZE, W., Pharmaz. Ztg. verein. Apotheker Ztg.
107, 1322 (1962).
- (6) BAMANN, E. u. ULLMANN, E., Chemische Untersuchung von Arznei-
gemischen, Arzneispezialitäten und Giftstoffen, Wissen-
schaftl. Verlagsgesellschaft, Stuttgart, 2. Aufl. 1960.
- (7) BASELT, R.C. u. CASARETT, L.J., J. Chromatogr. 57, 139 (1971).
- (8) BASTOS, M.L., KANANEN, G.E., YOUNG, R.M., MONFORTE, J.R.
u. SUNSHINE, I., Clin. Chem. (New York) 16, 931 (1970).
- (9) BÄUMLER, J., BRAULT, A.L. u. IM OBERSTEG, J., Schweiz.
Arch. Tierheilkunde 106, 346 (1964).
- (10) BÄUMLER, J., EGLOFF, K. u. RIPPSTEIN, S., Pharmac. Acta
Helvetiae 44, 85 (1969).
- (11) BÄUMLER, J. u. RIPPSTEIN, S., Pharmac. Acta Helvetiae
36, 382 (1961).
- (12) BECKETT, A.H. u. BROOKES, L.G., J. Pharmacy Pharmacol.
23, 288 (1971).
- (13) BECKETT, A.H. u. ROWLAND, M., Nature (London) 204, 1203 (1964).
- (14) BECKETT, A.H. u. ROWLAND, M., Nature (London) 206, 1260 (1965).
- (15) BECKETT, A.H. u. ROWLAND, M., J. Pharmacy Pharmacol.
17, 628 (1965).
- (16) BECKETT, A.H. u. ROWLAND, M., J. Pharmacy Pharmacol.
17, 59 (1965).
- (17) BECKETT, A.H., TUCKER, G.T. u. MOFFAT, A.C., J. Pharmacy
Pharmacol. 19, 273 (1967).
- (18) BECKETT, A.H. u. WILKINSON, G.R., J. Pharmacy Pharmacol.
17, 107S (1965).
- (19) BECKETT, A.H. u. WILKINSON, G.R., J. Pharmacy Pharmacol.
17, 104S (1965).

- (20) BERRY, D.J. u. GROVE, J., J. Chromatogr. 61, 111 (1971).
- (21) BEYER, K.H., Z. analyt. Chem. 212, 139 (1965).
- (22) BEYER, K.H. u. SKINNER, J.T., J. Pharmacol. exp. Therapeut. 68, 419 (1940).
- (23) BLOMQUIST, M., BONNICHSEN, R., FRI, C.G., MARDE, Y. u. RYHAGE, R., Z. Rechtsmed. 69, 52 (1971).
- (24) BONNICHSEN, R., MAEHLY, A.C., MARDE, Y., RYHAGE, R. u. SCHUBERT, B., Z. Rechtsmed. 67, 19 (1970).
- (25) BRANDENBERGER, H., Vortrag Analytica München, ref. in Z. analyt. Chem. 259, 210 (1972).
- (26) BRANDENBERGER, H. u. HELLBACH, E., Helv. chim. Acta 50, 958 (1967).
- (27) BRANNON, W.L., J. Assoc. offic. Anal. Chem. 53, 599 (1970).
- (28) BROCHMANN-HANSEN, E. u. SVENDSEN, A.B., J. pharmac. Sci. 51, 938 (1962).
- (29) BROOKS, C.J. u. HORNING, E.C., Analytic. Chem. 36, 1540 (1964).
- (30) BRUCE, R.B. u. MAYNARD, W.R., Analytic. Chem. 41, 977 (1969).
- (31) BÜLOW, M., DELL, H.D., FIEDLER, J., KAMP, R. u. LORENZ, D., Arzneimittel-Forsch. 21, 86 (1971).
- (32) CAMPBELL, D.B., J. Pharmacy Pharmacol. 21, 129 (1969).
- (33) CAPELLA, P. u. HORNING, E.C., Analytic. Chem. 38, 316 (1966).
- (34) CARTONI, G.P. u. CAVALLI, A., J. Chromatogr. 37, 158 (1968).
- (35) CHUNDELA, B., Prag, pers. Mitteilung 1968.
- (36) CLARKE, E., Isolation and Identification of Alkaloids, in LUNDQUIST F., Methods of Forensic Science, Vol. I, Interscience Publishers Inc., New York, London 1962.
- (37) CLARKE, E., Isolation and Identification of Drugs, The Pharmaceutical Press, London 1969.
- (38) CLASING, D., ALFES, H., MÖLLMANN, H., TOSCHKE, H.G. u. REISCH, J., Sportarzt Sportmed. 19, 361 (1967).
- (39) CLASING, D., ALFES, H., MÖLLMANN, H. u. REISCH, J., Z. klin. Chem. klin. Biochem. 6, 108 (1968).
- (40) CLASING, D., ALFES, H., MÖLLMANN, H. u. REISCH, J., Z. klin. Chem. klin. Biochem. 7, 648 (1969).
- (41) COCHIN, J. u. DALY, J.W., J. Pharmacol. exp. Therapeut. 139, 160 (1963).
- (42) CURRY, A.S., Poison Detection in Human Organs, Charles C. Thomas, Springfield, Ill. 1963.

- (43) DAVIDOW, B., PETRI, N.L. u. QUAME, B., Amer. J. clin. Pathol. 50, 714 (1968).
- (44) DEBACKERE, M. u. LARUELLE, L., J. Chromatogr. 35, 234 (1968).
- (45) DEBACKERE, M. u. MASSART-LEEN, A.M., Arch. int. Pharmacodynam. Therap. 155, 459 (1965); zit. n. BECKETT u. Mt. (17).
- (46) DELALANDE, Courbevoie, Frankr. Mitt. des Forschungszentrums 1967.
- (47) DOLE, V.P., KIM, W.K. u. EGLITIS, I., J. Amer. med. Assoc. 198, 349 (1966).
- (48) DONIKE, M., Sportarzt Sportmed. 21, 27 (1970).
- (49) DONIKE, M., persönliche Mitteilung 1972.
- (50) DONIKE, M., JAENICKE, L., STRATMANN, D. u. HOLLMANN, W., J. Chromatogr. 52, 237 (1970).
- (51) DOPING-Symposion Freiburg 21.3.1970, Protokoll S. 3.
- (52) DOPING, Medizinische Kommission des IOC in Zusammenarbeit mit dem Organisationskomitee der Spiele der 20. Olympiade München 1972 und der 19. Olympischen Winterspiele Sapporo 1972, Lausanne 1972.
- (53) EBERHARDT, H. u. DEBACKERE, M., Arzneimittel-Forsch. 15, 929 (1965).
- (54) EBERHARDT, H., FREUNDT, K.J., v. CLARMANN, M. u. BOFINGER, M., Arch. Toxikol. 21, 175 (1965).
- (55) EBERHARDT, H., LERBS, O.W. u. FREUNDT, K.J., Arzneimittel-Forsch. 13, 804 (1963).
- (56) EL GENDI, S., KISSER, W. u. MACHATA, G., Mikrochim. Acta (Wien) 120 (1965).
- (57) FALES, H.M. u. PISANO, J.J., Analyt. Biochem. (New York) 3, 337 (1962).
- (58) FARMILO, Ch.G. u. GENEST, K., Alkaloids and Related Bases: Identifications, in STEWART, C.P. u. STOLMAN, A. (127).
- (59) FELTKAMP, H., Gaschromatographie, in GRAF, E. u. PREUSS, R. (66).
- (60) FERRARI, M. u. TOTH, C.E., J. Chromatogr. 9, 388 (1962); zit. n. WALDI, D. (136).
- (61) FREUNDT, K.J. u. SCHWINGER, G., Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Pathol. Pharmacol. 246, 90 (1963).
- (62) FUCHS, A., Monatsh. f. Chem. 43, 129 (1932); zit. n. LIEB, H. u. SCHÖNINGER, W. (85).

- (63) GELDMACHER v. MALLINCKRODT, M. u. MANG, U., Z. klin. Chem. klin. Biochem. 8, 259 (1970).
- (64) GOLDBAUM, L.R., DOMANSKI, Th.I., An Approach to the Analysis of Biological Specimens for Basic Drugs; in STOLMAN, A., Progress in Chemical Toxicology, Vol. 2, Acad. Press, New York, London, 221, 1965.
- (65) GOLDENBERG, H. u. FISHMAN, V., Biochem. Pharmacol. 14, 365 (1965); zit. n. WALDI, D. (136).
- (66) GRAF, E. u. PREUSS, R., Gadamer's Lehrbuch der chem. Toxikologie und Anleitung zur Ausmittlung der Gifte, Bd. II, Verlag Vandenhoeck u. Ruprecht, Göttingen, 3. Aufl. 1966.
- (67) HAUCK, G., Acta Med. Leg. Soc. 15, 87 (1962).
- (68) HAUCK, G., Dtsch. Z. ges. gerichtl. Med. 54, 198 (1963).
- (69) HAUCK, G., JANZEN, J. u. TERFLOTH, H.P., Blutalkohol 7, 68 (1970).
- (70) HAUCK, G. u. WOLF, M.H., Internat. Symposion über Doping, Brunn 1969, s.a. Beitr. gerichtl. Med. 28, 349 (1971).
- (71) HAYDEN, A.L., BRANNON, W.L. u. CRAIG, N.R., J. pharm. Sci. 57, 858 (1968).
- (72) HEATON, A.M. u. BLUMBERG, A.G., J. Chromatogr. 41, 367 (1969).
- (73) HESSE, G., DANIEL, I. u. WOHLLEBEN, G., Angew. Chem. 64, 103 (1952).
- (74) HEYNDRIKX, A. u. DE LEENHEER, A., J. Pharmac. Belgique 109 (1967).
- (75) IPPEN, H., Index Pharmacorum, Georg Thieme Verlag, Stuttgart 1968.
- (76) JATZKEWITZ, H., Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 292, 94 (1953).
- (77) KAISTHA, K.K. u. JAFFE, J.H., J. Chromatogr. 60, 83 (1971).
- (78) KLEIN, W.J., Analytic. Chem. 41, 667 (1969).
- (79) KLEIN, W.J. u. ULBERT, K., Analytic. Chem. 41, 682 (1969).
- (80) KOFLER, L. u. KOFLER, A., Thermomikromethoden zur Kennzeichnung organischer Stoffe und Stoffgemische, Verlag Chemie, Weinheim, 3. Aufl. 1954.
- (81) KOVATS, E., Helv. chim. Acta 41, 1915 (1958).
- (82) KUNTZMANN, R.G., TSAI, J., BRAND, L. u. MARK, L.C., Clin. Pharmacol. Therap. 12, 62 (1971).
- (83) LEBBE, J., LAFARGE, J.P. u. LAPLACE, M., 5. Varian Symposion über Gaschromatographie, Genf, 67, 1966.

- (84) LEBISH, P., FINKLE, S.B. u. BRACKETT, J.W., Clin. Chem. (New York) 16, 195 (1970).
- (85) LIEB, H. u. SCHÖNINGER, W., Anleitung zur Darstellung organischer Präparate mit kleinen Substanzmengen, Springer Verlag, Wien, 2. Aufl. 1961.
- (86) MACHATA, G., Mikrochim. Acta 79 (1960).
- (87) MACHATA, G., Dtsch. Z. ges. gerichtl. Med. 57, 335 (1966).
- (88) MACHATA, G., Dtsch. Z. ges. gerichtl. Med. 59, 181 (1967).
- (89) MARTINEK, A., Mikrochim. Acta 877 (1971).
- (90) MASON, W.B., The Pittsburgh Konferenz on Analytical Chemistry and Applied Spectroscopy 1958.
- (91) MEYER v., L., Toxikologische Arbeitstagung München, 24. April 1972.
- (92) MOERMAN, E., in Doping-Proceedings of an International Seminar, DE SCHAEPPDRYVER, A. u. HEBBELINCK, M., Pergamon, London 1964; zit. n. BECKETT (17).
- (93) MÖLLMANN, H., ALFES, H. u. REISCH, J., Med. Welt 20, 1268 (1967).
- (94) MONTALVO, J.G., KLEIN, E., EYER, D. u. HARPER, B., J. Chromatogr. 47, 542 (1970).
- (95) MÜHLEMANN, H. u. BÜRGIN, A., Qualitative Arzneimittelanalyse, Verlag Ernst Reinhardt, München, Basel, 2. Aufl. 1956.
- (96) MULÉ, S.J., J. Chromatogr. 39, 302 (1969).
- (97) MULÉ, S.J., J. Chromatogr. 55, 255 (1971).
- (98) MULÉ, S.J., BASTOS, M.L., JUKOFSKY, D. u. SAFFER, E., J. Chromatogr. 63, 289 (1971).
- (99) MUNIER, R. u. MACHEBOEUF, M., Bull. Soc. Chim. biol. 33, 846 (1951); zit. n. STAHL, E. (125).
- (100) NARASIMHACHARI, N. u. VOUIROS, P., Analyt. Biochem. (New York) 45, 154 (1972).
- (101) NEUBAUER, D. u. MOTHES, K., Planta med. Stuttgart 9, 466 (1961); zit. n. WALDI, D. (136).
- (102) NOIRFALISE, A., J. Chromatogr. 19, 68 (1965).
- (103) NOIRFALISE, A., J. Chromatogr. 20, 61 (1965).
- (104) NOIRFALISE, A., Ann. Biol. clin. 24, 943 (1966).
- (105) NÜRNBERG, E., Arch. Pharmaz. Ber. dtsch. pharmaz. Ges. 292, 610 (1959).
- (106) OPITZ, K. u. WEISCHER, M.L., Arzneimittel-Forsch. 16, 1311 (1966).

- (107) PALITZSCH, R., BEYRICH, Th. u. POHLOUDEK-FABINI, R., Pharmazie 23, 246 (1968).
- (108) PARKER, K.D., KIRK, P.L. u. FONTAN, Ch. R., Analyt. Chem. 34, 1345 (1962).
- (109) PAULUS, W., HOCH, W. u. KEYMER, R., Arzneimittelforsch. 13, 609 (1963).
- (110) POHLOUDEK-FABINI, R. u. KÖNIG, K., Pharmazie 15, 61 (1960).
- (111) PROKOP, L., XI. Congr. internat. de Medicine Sportive, Luxembourg 1956, Luxembourg 1957; zit. n. PROKOP (112).
- (112) PROKOP, L., Doping aus ärztlicher Sicht, Verband österreichischer Sportärzte, Wien 1967.
- (113) PROKOP, L., in DOPING (52).
- (114) RABIAN, J., SERGANT, M. u. GAUDIN, A.F., Ann. pharmac. franc. 29, 331 (1971).
- (115) RAMSEY, J. u. CAMPBELL, D.B., J. Chromatogr. 63, 303 (1971).
- (116) RANDERATH, K., Dünnschichtchromatographie, Verlag Chemie, Weinheim 1962.
- (117) RATHENASINKAM, E., Analyst 77, 135 (1952); zit. n. Z. analyt. Chem. 140, 240 (1953).
- (118) RISTIC, S. u. THOMAS, A., Arch. Pharmaz. Ber. dtsch. pharmaz. Ges. 295, 524 (1962).
- (119) RÖDER, E., MUTSCHLER, E. u. ROCHELMMEYER, H., J. Chromatogr. 42, 131 (1969).
- (120) RÖDER, E., MUTSCHLER, E. u. ROCHELMMEYER, H., Pharmazie 24, 238 (1969).
- (121) SCHILL, G., 8. Internationaler Kongreß für Klinische Chemie, Kopenhagen 1972.
- (122) SCHRIEVER, K. u. Arzneibüro der ABDA, Lexikon chemischer Kurzbezeichnungen von Arzneistoffen, Govi-Verlag, Frankfurt/Main 1968.
- (123) SCHWEITZER, J.W. u. FRIEDHOFF, A.J., Clin. Chem. 16, 786 (1970).
- (124) STAHL, E., Dünnschichtchromatographie, ein Laboratoriumshandbuch, Springer Verlag, Berlin, Göttingen, Heidelberg 1962.
- (125) STAHL, E., Dünnschichtchromatographie, Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York, 2. Aufl. 1967.
- (126) STEELE, J.W., BOLAN, M. u. EYOLFSON, J.K., Canad. J. pharmac. Sci. 5, 107 (1970).
- (127) STEWART, C.P. u. STOLMAN, A., Toxicology, Mechanisms and Analytical Methods, Vol. 2, Acad. Press, New York, 1961.

- (128) STONE, H. M. u. HENWOOD, C. R., J. Forens. Sci. Soc. 7, 51 (1967).
- (129) STREET, H. V., J. Chromatogr. 29, 68 (1967).
- (130) STREET, H. V., J. Chromatogr. 37, 162 (1968).
- (131) THOMPSON, G. F. u. SMITH, K., Analytic. Chem. 37, 1591 (1965).
- (132) UHLMANN, H. J., Pharmaz. Ztg. verein. Apotheker Ztg. 25, 936 (1967).
- (133) VIDIC, E., Arch. Toxikol. 17, 373 (1959).
- (134) VIDIC, E., Betäubungs- und Suchtmittelnachweis; in PONSOLD, A., Lehrbuch der Gerichtsmedizin, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 3. Aufl. 1967.
- (134a) VIDIC, E. u. NOACK, P. bei VIDIC, E. (134).
- (135) VIDIC, E. u. SCHÜTTE, J., Arch. Pharmaz. Ber. dtsh. pharmaz. Ges. 295, 342 (1962).
- (136) WALDI, D., Dünnschichtchromatographie, in GRAF, E. u. PREUSS, R. (66).
- (137) WALDI, D., MUNTER, F. u. SCHNACKERZ, K., J. Chromatogr. 6, 61 (1961).
- (138) WALLACE, J. E., BIGGS, J. D. u. LADD, S. L., Analytic. Chem. 40, 2207 (1968).
- (139) WALLACE, J. E. u. LADD, S. L., Ind. Medicine 39, 412 (1970).
- (140) WARREN, R. J., BEGOSH, P. P. u. ZAREMBO, J. E., J. Assoc. Offic. Analytic. Chem. 54, 1179 (1971).
- (141) WEISCHER, M. L. u. OPITZ, K., Arzneimittel-Forsch. 17, 625 (1967).
- (142) WEISSMAN, N., LOWE, M. L., BEATTIE, J. B. u. DEMETRIOU, J. A., Clin. Chem. 17, 875 (1971).
- (143) WESLEY-HADZIJA, B., J. Pharmacy Pharmacol. 23, 366 (1971).
- (144) WICKSTRÖM, A. u. SALVESEN, B., J. Pharmacy Pharmacol. 4, 635 (1952).
- (145) WIENERT, V., Diss. Bonn 1966.
- (146) WINTERFELD, K., Praktikum der organisch-präparativen Pharmazeutischen Chemie und Lehrbuch der anorganisch-chemischen Arzneimittelanalyse, Verlag Theodor Steinkopff, Dresden u. Leipzig, 6. Aufl. 1965.

LEBENS LAUF

- 2.1.1941 Geboren in Nürnberg.
Vater: Josef Wolf, Polizeibeamter,
Mutter: Elisabetha Wolf, geb. Trinker, Buchhalterin.
- 1946-1951 Besuch der Volksschule in Georgensgmünd,
Kreis Schwabach.
- 1951-1960 Besuch der Oberrealschule in Schwabach.
- 13.6.1960 Abitur an der Oberrealschule in Schwabach.
- Sept. 1960-
Sept. 1962 Praktikant in der Adler-Apotheke in Nürnberg.
- 13.9.1962 Pharmazeutische Vorprüfung in Nürnberg.
- Nov. 1962-
Febr. 1966 Studium der Pharmazie an der Universität
Erlangen-Nürnberg.
- 11.3.1966 Pharmazeutische Staatsprüfung in Erlangen.
- 1.4.1966-
14.2.1967 Kandidat in der Marienapotheke Neumarkt.
- Febr. 1967-
Sept. 1967 Arbeitsunfähig wegen Krankheit.
- 31.8.1967 Eheschließung mit Marianne Knapp aus Wendelstein.
- Ab 1.10.1967 Doktorand bei Prof. Dr. G. Hauck am Institut für
Gerichtliche Medizin und Versicherungsmedizin in
Freiburg.
- 21.2.1968 Bestallung als Apotheker.
- Ab 1.8.1969 Verwalter einer wissenschaftlichen Assistentenstelle
am Institut für Gerichtliche Medizin und Versicherungs-
medizin in Freiburg.
- 2.10.1972-
1.1.1973 Zwischenzeitliche Ableistung der Grundwehrübung.

